



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**TESIS DOCTORAL**

**MV. LUCÍA ANA DEMALDÉ**

**2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de*  
**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**EFFECTO DEL ANDRÓGENO ENANTATO DE TESTOSTERONA EN FELINOS  
DOMÉSTICOS (*FELIS CATUS*) PREPÚBERES**

**AUTOR: Med. Vet. DEMALDÉ, Lucía A.**

**DIRECTOR: Dra. GOBELLO, Cristina, DECAR**

**CO-DIRECTOR: Dra. FERNÁNDEZ, Patricia**

**LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Facultad de Ciencias  
Veterinarias, UNLP**

**MIEMBROS DE JURADO:**      **Dr. CASTILLO, Víctor**  
   **Dr. MIRAGAYA, Marcelo**  
   **Dra. TORRES, Perla**

**Año 2017**

*A todos los que me acompañaron  
en este camino...*

“La ciencia no conoce país, porque el  
conocimiento pertenece a la humanidad,  
y es la antorcha que ilumina el mundo”

*Louis Pasteur*

## AGRADECIMIENTOS

- Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral.
- Mi Directora, la Dra. Cristina Gobello, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma.
- Mi Codirectora, la Dra. Patricia Fernández, por sus correcciones y sugerencias.
- Mis compañeros de trabajo, Anita, Mari, Ro, Flor, Cami y Pablo por su colaboración, buena predisposición y hacer un ambiente laboral agradable cada día.
- Mis padres, que con su ejemplo me han enseñado que si uno quiere algo debe luchar por ello, siempre con honestidad y ética. Gracias por su apoyo incondicional.
- Mis hermanos, Mari, Fran y José, que han estado presentes a lo largo de todo este proceso aún desde la distancia. Gracias por escucharme, aconsejarme, y estar siempre.
- Mis sobrinos, Ángeles y Jeremías que son la luz en mi vida.
- Mi amor y compañero de vida, Alejandro.
- Dios que me acompañó y acompaña en cada momento.
- Mis amigos por la comprensión, paciencia y el ánimo recibido. A todos ellos, muchas gracias.
- La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por abrirme las puertas y brindarme una formación académica de excelencia.
- La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por otorgarme una beca doctoral y así poder dedicarme exclusivamente a mis estudios de doctorado, y por proporcionar a través del PICT 2012-0073 gran parte de la financiación de esta Tesis.

## PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

### Publicaciones en revistas internacionales

- **Demaldé L**, Lopez Merlo M, Vercellini R, Barbeito C, Fernández P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. *Animal Reproduction Science*. 2016; 171: 65-71

### Presentaciones en congresos nacionales e internacionales

- **Demaldé L**, Carranza A, López Merlo M, De La Sota P, Batista P, Blanco P, Gobello C. Anovulación en hembras felinas tratadas con andrógenos postnatales: reporte preliminar. V Jornada de Jóvenes Investigadores. Facultad de Ciencias veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina 10-12/06, 2015
- **Demaldé L**, Carranza A, López Merlo M, De La Sota P, Batista P, Blanco P, Rube A, Gobello C. Anovulation in postnatal androgen treated female cats: A preliminary report. 18th EVSAR International congress. Canine and feline reproduction Hannover, Alemania 11-12/09, 2015
- **Lucía Demaldé**, Mariana López Merlo, Rosario Vercellini, Claudio G. Barbeito, Patricia Fernández, Cristina Gobello. 2016. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. 20th ANNUAL ESDAR CONFERENCE 2016 European Society for Animal Reproduction. Lisbon, Portugal 27-29/10, 2016

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS _____	1
RESUMEN _____	2
SUMMARY _____	4
INTRODUCCIÓN GENERAL _____	5
CAPÍTULO I _____ <i>Efecto del disruptor androgénico enantato de testosterona en hembras felinas postnatas</i>	15
CAPÍTULO II _____ <i>Efecto del disruptor androgénico enantato de testosterona en machos felinos postnatos</i>	34
CONCLUSIONES FINALES _____	50

## ABREVIATURA

**ET:** enantato de testosterona

**PL:** placebo

**sc:** subcutánea

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotrofinas

**LH:** hormona luteinizante

**P<sub>4</sub>:** progesterona

**17 $\beta$ -E<sub>2</sub>:** 17 $\beta$ -estradiol

**T:** testosterona

**vs:** versus

**$\mu\text{m}^2$ :** micrómetro cuadrado

**$\mu\text{m}$ :** micrómetro

**C:** carbono

**OH:** radical hidroxilo

**RIA:** radioinmunoensayo

**SEM:** error estándar de la media

**ANOVA:** análisis de la varianza

## EFECTO DEL ANDRÓGENO ENANTATO DE TESTOSTERONA EN FELINOS DOMÉSTICOS (*FELIS CATUS*) PREPÚBERES

Palabras claves: Felino doméstico, Enantato de Testosterona, Contracepción, Postnatal

### RESUMEN

Con el objetivo de describir el efecto de un andrógeno en el control de la reproducción indeseada de los felinos domésticos se realizó un estudio aleatorizado con grupo placebo. Los gatos fueron ubicados en los siguientes tratamientos: Enantato de testosterona (ET) 12,5 mg (n=13) o Placebo (PL; n=10) subcutáneos durante las primeras 24 horas de vida. Los felinos se controlaron clínica, reproductiva y endocrinológicamente hasta la pubertad cuando se probó su fertilidad *in vivo*. Finalmente, los animales fueron castrados y sus gónadas y úteros estudiados macro y microscópicamente. La anovulación se produjo en 6/8 vs. 0/5 hembras del grupo ET y PL, respectivamente ( $p<0,05$ ) y la fertilidad en 1/8 vs. 3/5 hembras de los mismos grupos ( $p>0,1$ ). Los machos resultaron fértiles 4/5 vs. 5/5 del grupo ET y PL, respectivamente ( $p>0,1$ ). En ambos sexos, las concentraciones de testosterona fecales fueron más elevadas en el grupo ET durante las 2 primeras semanas ( $p<0,05$ ). Las concentraciones fecales de  $17\beta$ -estradiol en hembras no presentaron diferencias entre los tratamientos ( $p>0,1$ ). Todas las hembras ET presentaron transitoriamente agrandamiento de la vulva y del clítoris y una de ellas tuvo nódulos mamarios. En los ovarios se hallaron folículos en crecimiento y cuerpos lúteos, en los animales anovulatorios y los que ovularon, respectivamente. La evaluación microscópica uterina reveló que en el área ocupada por las glándulas uterinas ( $p<0,01$ ), la altura del epitelio glandular y luminal, fue menor en el grupo ET ( $p<0,05$ ). En los machos ET disminuyó, aunque no significativamente, el peso y volumen testicular, el diámetro y la longitud de los túbulos seminíferos así como el volumen de espermatogonias y células de Sertoli. La disrupción endócrina con un andrógeno de larga acción



durante la ventana crítica postnatal provocó una alta proporción de infertilidad anovulatoria y efectos adversos transitorios. Este tratamiento podría tener un futuro contraceptivo en esta especie.

## **EFFECT OF THE TESTOSTERONE ENANTHATE, IN PREPUBERTAL DOMESTIC CAT (*FELIS CATUS*)**

Key words: Domestic cat, Testosterone Enanthate, Infertility, Postnatal

### **SUMMARY**

To describe the effect of an androgen on the control of unwanted reproduction of domestic cats, a randomized controlled trial was carried out. The cats were allocated into one of the following treatments: Testosterone enanthate (TE) 12.5 mg (n = 13) or Placebo (PL; n = 10) subcutaneously within the first 24 hours of life. The felids were followed up clinically, reproductively and endocrinologically until puberty when their fertility was *in vivo* tested. Finally, they were castrated/spayed and their gonads and uteri were studied macro and microscopically. In females treated with TE, the anovulation occurred in 6/8 vs. 0/5 of the PL group ( $p < 0.05$ ) and the fertility was 1/8 vs. 3/5 for the same groups ( $p > 0.1$ ). The males were fertile 4/5 vs. 5/5 of the ET and PL groups, respectively ( $p > 0.1$ ). In both genders, fecal testosterone concentrations were higher in the TE group during the first 2 weeks ( $p < 0.05$ ). In females, fecal concentrations of  $17\beta$ -estradiol showed no differences between treatments ( $p > 0.1$ ). All TE females had transient enlargement of the vulva and clitoris and one of them demonstrated mammary nodules. Ovarian evaluation revealed growing follicles and corpora lutea, in those queens that had not ovulated and those which had ovulated, respectively. Microscopic uterine evaluation showed that in the area occupied by the uterine glands ( $p < 0.01$ ), the height of both the glandular and luminal epithelium were lower in the TE group than in the PL ( $p < 0.05$ ). TE males had decreased, although no significant, testicular weight and volume, diameter and length of the seminiferous tubules as well as the volume occupied by spermatogonias and Sertoli cells. Endocrine disruption with a long acting androgen during the critical postnatal time window caused a high proportion of anovulatory infertility and transient adverse effects. This treatment could have promise as a contraceptive strategy in this species.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Durante un largo periodo de tiempo la reproducción de los gatos domésticos (*Felis catus*) no ha sido suficientemente estudiada. Sin embargo, en las últimas décadas los trabajos en esta especie se han incrementado debido a su uso como modelo biológico experimental para el estudio de la reproducción de felinos en vías de extinción (Axnér y Forsberg, 2002). También ha influido en este incremento el hecho de que los gatos, aumentaron notablemente su popularidad como mascotas ya que se adaptan fácilmente a los espacios reducidos y a largas jornadas laborales de sus propietarios (Zasloff, 1996).

La gata doméstica, al igual que otros mamíferos domésticos tales como la yegua, cabra y oveja, comparte la particularidad de ser poliéstrica estacional, es decir que ciclará de manera repetida durante una estación reproductiva (Feldman y Nelson, 2000). En nuestro hemisferio el período reproductivo de la gata comprende las estaciones de primavera y verano, sin embargo, bajo un régimen lumínico artificial de 12-14 horas de luz diarias, ciclan durante todo el año (Robledo y col., 2003). Por el contrario, si las gatas son expuestas a un régimen lumínico diario corto, 8 horas de luz diarias, la actividad ovárica cesa y consecuentemente la hembra entra en anestro estacional (Leyva y col., 1989).

Se considera que la gata doméstica alcanza la pubertad cuando ha ganado por lo menos el 80% de su peso adulto, es decir, 2,3 kg a 3,2 kg (Concannon y Lein, 1983). Asimismo, el comienzo de la actividad ovárica está influenciado por varios factores entre ellos la época del año en que la hembra nace. Así, aquellas que nacen en invierno comienzan su actividad sexual más tempranamente que aquellas que nacen en verano (Tsutsui y col., 2004). Por otro lado, la pubertad presenta cierta heredabilidad; es así que razas de pelo corto como el Siamés son más precoces que las razas de pelo largo como la Persa (Povey, 1978).

En la hembra felina doméstica la ovulación es, generalmente, inducida por el coito (Verstegen, 1998). El principal mecanismo fisiológico para la ovulación es un arco reflejo vaginal -médula -hipotálamo en el que la estimulación de la cópula conduce a la liberación de la hormona liberadora de

gonadotrofinas (GnRH) y ésta induce la liberación de la hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis anterior (Verstegen, 2002). Dependiendo del día de la fase folicular en el cual se encuentre la hembra y del número y frecuencia de coitos, se producirá o no liberación suficiente de LH para provocar la ovulación (Lawer y col., 1993). La frecuencia de servicios es regulada por la receptividad de la hembra; puede variar entre 3 y 8 veces en 4 horas o 20-30 veces en 36 horas. Debido a que menos del 50% de las hembras ovulan con un solo servicio, para lograr preñez se aconseja realizar un mínimo de 4 servicios por día en un lapso de 4 horas durante el segundo y tercer día del estro (Lawer y col., 1993). También se ha demostrado que el 25-30% de las gatas aisladas o alojadas en grupos presentan ovulación espontánea (Gudermunth y col., 1997).

El apareamiento pocas veces es visualizado debido a que se produce muy rápidamente. El macho efectúa, en primer término, un reconocimiento de la hembra olfateando la zona genital, luego aborda a ésta lateralmente y la toma por el cuello, incluso a veces se especula sobre la ocurrencia del servicio por la presencia de saliva en el cuello de la hembra. La gata eleva la pelvis, desvía la cola y realiza movimientos de pisoteo con sus cuartos posteriores, emitiendo vocalizaciones y maullidos al tiempo que el macho realiza la penetración y eyaculación (Feldman y Nelson, 2000). Una vez ocurrido el servicio, en la hembra se produce una reacción postcoital, en la cual yace repetidamente sobre el flanco, frotándose contra el terreno, rodando y sacudiéndose de un lado al otro, interrumpiendo esta acción por lamido obsesivo del área genital, al tiempo que repele todo intento de acercamiento del macho (Feldman y Nelson, 2000).

Si ocurre la ovulación y se produce la fertilización, comienza una gestación. Esta última tiene una duración promedio de 63 a 67 días (Jemmett y Evans, 1977). Si los servicios se realizan durante varios días la ovulación puede ocurrir en cualquiera de ellos, ocasionando un alargamiento aparente de la gestación, si se cuenta desde el primer día del servicio (Root y col., 1995; Soame, 1936). En el caso de que la fertilización fracase se inicia una fase lútea denominada “pseudogestación”, con una duración de alrededor de 40 días (Verstegen, 1998). Luego de cada fase folicular y gestación o fase lútea vacía la hembra entra en un período corto de reposo sexual llamado interestro. La duración de este intervalo

varía de 8 a 10 días promedio (Johnston y col., 2001). Luego retoma nuevamente la actividad sexual, o bien entra en anestro estacional, si ha finalizado la temporada reproductiva.

El anestro es un período caracterizado por la ausencia de ciclos estrales. Esta fase ocurre fisiológicamente cuando disminuyen las horas de luz en otoño-invierno, con el consiguiente aumento de melatonina y prolactina, y concentraciones basales de estrógeno y progesterona ( $P_4$ ) (Verstegen, 1998). Durante este periodo la gata no atrae al macho y lo rechaza en forma agresiva.

En la especie felina la citología vaginal es un método utilizado como diagnóstico para evaluar el estadio del ciclo estral. En un extendido de células vaginales se pueden encontrar células parabasales, intermedias y superficiales dependiendo el tamaño y forma de las mismas. Así, las gatas en celo presentan una citología vaginal con más del 80% de células superficiales que pueden ser nucleadas o anucleadas; las hembras en interestro presentan mayoría de células epiteliales intermedias y ocasionalmente puede observarse la presencia de neutrófilos, finalmente en las que están en anestro hay predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias y leucocitos (Mills y col., 1979).

Los machos felinos alcanzan, normalmente, la pubertad con un peso aproximado de 3,5 kg y edad variable. Contrariamente a lo que sucede con las hembras, los machos son fértiles durante todo el año, aunque la libido y la fertilidad se ven atenuadas durante los meses con menos horas de luz (Schmidt, 1986). Los gatos machos nacen con los testículos descendidos en las bolsas escrotales. La barrera hematotesticular y la presencia de células de Leydig maduras se establecen durante el período de la pubertad (Sánchez y col., 1993) y el ciclo espermático tiene una duración de 46,8 días (Franca y Godinho, 2003). El pene del gato está cubierto por 100-200 espículas cornificadas y curvas, de 1 mm de largo, que se dirigen hacia la base del pene (Feldman y Nelson, 1996). Estas espículas se desarrollan en la peripubertad y estimulan la liberación de LH pituitaria en la hembra al momento del coito (Aronson y Cooper, 1967). En los machos de esta especie la separación balano prepucial y la presencia de espículas demuestran el desarrollo sexual adulto (Johnston y col., 2001).

Debido a sus particularidades reproductivas, los felinos domésticos son sumamente prolíficos (Griffin, 2001a, b). Por ejemplo, una hembra puede producir más de tres camadas de 4 a 5 cachorros por año.

Así, una sola pareja de gatos puede producir exponencialmente más de 400.000 animales en 7 años. Los felinos, además, son difíciles de confinar, hecho que se agrava durante la temporada reproductiva constituyendo un problema sanitario y social severo a nivel nacional y mundial.

El control de la reproducción en esta especie se realiza rutinariamente en forma quirúrgica, farmacológica o una combinación de ambas. No obstante, la comúnmente realizada gonadectomía, es costosa, requiere personal entrenado, infraestructura, equipamiento y tiempos de ejecución y recuperación muy prolongados para el control masivo de grandes poblaciones de animales. Por otro lado, el control farmacológico se realiza con hormonas, generalmente esteroides sexuales como los progestágenos y, menos frecuentemente, los andrógenos.

Los progestágenos, análogos sintéticos de la  $P_4$ , son compuestos farmacéuticos comúnmente utilizados para controlar el ciclo reproductivo de los animales domésticos. No obstante, suelen provocar importantes efectos colaterales en la especie como metro y mastopatías (Romagnoli y Concannon, 2003).

Por su lado, los andrógenos son también esteroides derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, cuyas funciones principales consisten en completar la diferenciación sexual del hipotálamo, la maduración y función de los órganos sexuales y el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (Dakin y col., 2008). La testosterona (T) es un andrógeno que está compuesto por 19 átomos de carbono (C), un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C12, resultando la siguiente fórmula  $C_{19}H_{28}O_2$ . En los mamíferos, la T es sintetizada principalmente por los testículos y los ovarios, aunque pequeñas cantidades son producidas por las glándulas suprarrenales, ejerciendo su acción en los tejidos blancos mediante tres mecanismos. Uno es uniéndose directamente a sus receptores androgénicos. Otro es bajo su conversión mediante la enzima  $5\alpha$  reductasa en  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, la cual tiene afinidad por el mismo receptor androgénico que la T. Por último, también actúan mediante su aromatización en estradiol y ejerciendo acción sobre receptores estrogénicos (Mooradian y col., 1987). El efecto de los andrógenos sobre la reproducción es, similar al de la  $P_4$ , es decir retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, ocasionando una disminución de la secreción de GnRH y, consecuentemente de gonadotrofinas hipofisarias, resultando

en supresión de la espermatogénesis y de la actividad ovárica en el macho y la hembra, respectivamente (Romagnoli, 2009). Los andrógenos no son usados en el control de la reproducción tradicional en los animales adultos de esta especie por sus efectos virilizantes tales como hipertrofia del clítoris, aumento de la conducta sexual y agresividad (Romagnoli, 2009).

Por lo expuesto, es posible concluir que el control de la reproducción indeseada de los felinos domésticos está muy lejos de lograr ser manejado nacional e internacionalmente (ACCD, 2002, 2004). En este aspecto, los lineamientos internacionales para abordar el problema apuntan a la búsqueda de protocolos farmacológicos de única dosis, seguros, efectivos en ambos sexos y con efectos esterilizantes.

El incremento de las hormonas gonadales durante el período perinatal es un fenómeno fisiológico que ocurre en la mayoría de los mamíferos (Gore, 2008). Este aumento se debe al desbloqueo del eje hipotálamo hipofisiario gonadal del postnato producido por la elevada concentración de hormonas maternas durante la gestación (Burger y col., 1991; Corbier y col., 1992; Herath y col., 2001). Luego de este periodo, de duración variable, los esteroides gonadales declinan lentamente hasta alcanzar los valores basales típicos de los animales prepúberes (Kolho y Huhtaniemi, 1989). En roedores y primates las concentraciones plasmáticas elevadas de esteroides sexuales durante el periodo postnatal afectan profundamente los patrones de diferenciación sexual del sistema nervioso central, la fisiología reproductiva y el comportamiento, así como también el desarrollo y la madurez del sistema inmune (Mann y Fraser, 1996; Pryor y col., 2000; Kolho y Huhtaniemi, 1989). Existe, por lo tanto, un período crítico de vulnerabilidad en esta etapa. Si durante esta ventana de tiempo se producen exposiciones a agentes exógenos (disruptores), éstos podrían afectar la competencia sexual del adulto (Pryor y col., 2000).

El periodo de desarrollo reproductivo es específico de especie y depende del estado de madurez de los animales al momento del nacimiento (Gorski, 1985). Así los carnívoros domésticos nacen con un estado de madurez inferior al del resto de las especies domésticas. En los gatos domésticos el período crítico de vulnerabilidad se extiende desde la semana 1 hasta la semana 5 postnatal, donde se encontró un aumento significativo de los esteroides sexuales seguido posteriormente de una notable

disminución a concentraciones basales hasta la prepubertad (Faya y col., 2013). Si durante esta ventana de tiempo se producen exposiciones a disruptores endocrinos, éstos podrían afectar el potencial reproductivo del adulto (Pryor y col., 2000). Un disruptor endócrino es una sustancia exógena, con efectos deletéreos en las funciones hormonales de un individuo o de sus descendientes, debido a cambios en la función endócrina (Cravedi y col., 2007).

La androgenización de ratas hembras, hámster (Gorski, 1979), cerdas (Ventanas y col., 1992) y perras (Beach y col., 1983) durante el periodo postnatal resulta en esterilidad. También, en machos androgenizados neonatalmente se observaron alteraciones sexuales anatómicas, endocrinas y de conducta (Diamond y col., 1973; Piacsek y Hostetter, 1984; Vanderstichele y col., 1987; Ventanas y col., 1992).

Hasta el momento, no existen estudios con andrógenos en el período crítico del desarrollo sexual postnatal en felinos con fines contraceptivos. El enantato de testosterona, un andrógeno sintético, potente, de larga acción y ampliamente disponible en el mercado (Plumb, 2006), fue seleccionado como disruptor endocrino del presente estudio.

En base a lo descripto anteriormente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue contribuir al control de la reproducción indeseada en felinos domésticos mediante los objetivos específicos de:

- ☐ Describir los efectos reproductivos clínicos, endocrinológicos, comportamentales e histológicos luego de la administración postnatal de un andrógeno de larga acción en felinos domésticos (*Felis Catus*).
- ☐ Probar la seguridad clínica del tratamiento.



## Referencias

1. Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the International Symposium of Non surgical methods for pet population control. Georgia, USA 2002; p. 110.
2. Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the 2nd International Symposium of Non surgical methods for pet population control. Colorado, USA 2004; p. 204.
3. Aronson L, Cooper M. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anat Rec.* 1967; 157: 71-8.
4. Axné E, Forsberg L. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. En: Concannon P y col. Recent Advances in Small Animal Reproduction. Ithaca, New York, International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), 2002; p. 1-9.
5. Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. *Behav Neural Biol.* 1983; 38: 1-31.
6. Burger H, Yamada Y, Bangah M, Mc Cloud P, Warne G. Serum gonadotropin, sex steroid, and immunoreactive inhibin levels in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72: 682-6.
7. Concannon P, Lein D. Feline reproduction. En: Kirk R. Current Veterinary Therapy VIII. Philadelphia, USA, Ed Saunders, 1983; p. 936-87.
8. Corbier P, Edwards D, Roffi J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992; 100: 127-31.
9. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF, Menuet A, Jégou B. The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci.* 2007; 23: 198-204.
10. Dakin CL, Wilson CA, Kalló I, Coen CW, Davies DC. Neonatal stimulation of 5-HT (2) receptors reduces androgen receptor expression in the rat anteroventral periventricular nucleus and sexually dimorphic preoptic area. *J Neurosci.* 2008; 27: 2473–80.

11. Diamond M, Alfonso Llacuna A, Wong CL. Sex behavior after neonatal progesterone, testosterone, estrogen, or antiandrogens. *Hormones and Behavior*. 1973; 4: 73–88.
12. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17b and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology*. 2013; 80: 584-6.
13. Feldman CE, Nelson RW. Reproducción de gatos. En: *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. 2da. ed. México, DF. Ed Mc Graw-Hill Interamericana. 2000; p. 806:36.
14. Feldman E, Nelson R. En: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2da. ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1996; p. 785.
15. Franca L, Godinho C. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 2003; 68: 1554-61.
16. Gore A. Developmental programming an endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29: 358-74.
17. Gorski RA. The neuroendocrinology of reproduction: an overview. *Biol Reprod*. 1979; 20: 111-27.
18. Gorski RA. Sexual differentiation of the brain: possible mechanisms and implications. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985; 63: 577–94.
19. Griffin B. Prolific cats: the estrous cycle. *Comp Contin Edu Pract Vet*. 2001a; 23: 1049-56.
20. Griffin B. Prolific cats: the impact of their fertility on the welfare of the species. *Comp Contin Edu Pract Vet*. 2001b; 23: 1058-69.
21. Gudermunth D, Newton L, Deals P, Concannon P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and fecal concentration of progesterone. *J Reprod Fert*. 1997; 51: 177-84.
22. Herath C, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome N, Suzuki A, Taya K. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat. *Biol Reprod*. 2001; 65: 1623-33.
23. Jemmett J, Evans J. Survey of Sexual-Behavior and Reproduction of Female Cats. *J Small Anim Prac*. 1977; 18: 31-7.

24. Johnston S, Root-Kustritz M, Olson P. Prevention and termination of feline pregnancy. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, Ed Saunders, WB, 2001; p. 447-52.
25. Kolho K, Huhtaniemi I. Suppression of pituitary-testis function in rats treated neonatally with a gonadotrophin-releasing hormone agonist and antagonist: acute and long-term effects. J Endocrinol. 1989; 123: 83-91.
26. Lawler D, Johnston S, Hegstad R, Keltner D, Owens S. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. J Reprod Fert. 1993; 47: 57-61.
27. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 125-33.
28. Mann D, Fraser H. The neonatal period: a critical interval in male primate development. J Endocrinol. 1996; 149: 191-7.
29. Mills J, Valli V, Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. CanVet J. 1979; 20: 95-101.
30. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. Endocrinol. 1987; 8: 1-28.
31. Piacsek BE, Hostetter MW. Neonatal Androgenization in the Male Rat: Evidence for Central and Peripheral Defects'. Biol Reprod. 1984; 30: 344-51.
32. Plumb DC. Manual de farmacología veterinaria. 5ta. ed. Buenos Aires. Argentina. Ed Inter-Médica. 2006; p. 680-82.
33. Povey RC. Reproduction in the pedigree female cat a survey of breeders. Can Vet J. 1978; 19: 207-13.
34. Pryor J, Hughes C, Foster W, Hales B, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. Environ Health Perspect. 2000; 108: 491-3.
35. Robledo MA, Carneiro MP, Raratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J. Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas. Bras Reprod Anim. 2003; 27: 274-5.

36. Romagnoli S, Concannon P. Uso clínico de progestinas en perras y gatas: una revisión. Recent Advances in Small Animal Reproduction Ithaca, New York, International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), 2003; p. 1-19.
37. Romagnoli S. Cómo controlo la reproducción en perros. Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference. Barcelona, Spain. Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), 2009; p. 1-5.
38. Root M, Johnston S, Olson P. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition length, litter size and juvenile mortality in the domestic cat. J Am Hosp Assoc. 1995; 31: 429-33.
39. Sánchez B, Pizarro M, García P, Flores J. Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. J Reprod Fert. 1993; 47: 349-53.
40. Schmidt P. Feline breeding management. Small Anm Pract. 1986; 16: 435-51.
41. Soame L. The gestation period of the cat. British Veterinary Journal. 1936; 92: 266-8.
42. Tsutsui T, Nakagawa K, Hirano T, Nagakubo K, Shinomiya M, Yamamoto K, Hori T. Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. J Vet Med Sci. 2004; 66: 1129-32.
43. Vanderstichele H, Eechaute W, Lacroix E, Leusen I. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat. J Steroid Biochem. 1987; 28: 421-7.
44. Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. Exp Clin Endocrinol. 1992; 99: 119-22.
45. Verstegen J. Reproducción felina. En: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinaria. 5ta. ed. Buenos Aires. Argentina. Ed Inter-Médica. 2002; p. 1764-80.
46. Verstegen J. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. En: Simpson, England, Harvey. Manual of small animal reproduction and neonatology. Cheltenham, UK, British Small Animal Veterinary Association. 1998; p. 11-6.
47. Zasloff R. A new appreciation for feline friends. Compend Contin Edu Pract Vet. 1996; 18: 4-4.

## **CAPÍTULO I**

### **EFFECTO DEL DISRUPTOR ANDROGÉNICO ENANTATO DE TESTOSTERONA EN HEMBRAS FELINAS POSTNATAS**

#### **Introducción**

Los esteroides sexuales tienen acción organizacional durante la gestación tardía y la vida postnatal temprana en especies altriciales y precoces tales como ratones, ratas y ovejas (Jackson y col., 2013). En particular, los andrógenos poseen efectos organizacionales sobre el sistema nervioso central en desarrollo durante el periodo postnatal temprano (Jackson y col., 2013).

En la rata hembra, existe un periodo crítico postnatal, en el cual una única administración de andrógenos altera en forma permanente los mecanismos hipotalámicos que rigen los patrones cíclicos de liberación de gonadotrofinas y la respuesta de los tejidos blanco a los estrógenos (Gorski, 1971; Harris y Naftolin, 1970; Lobl, 1975; Lobl y Gorski, 1974; Mena y col., 1992). Como resultado, las hembras androgenizadas son anovulatorias y presentan alteraciones en la morfología y función uterina, así como también exhiben algún grado de comportamiento masculino (Barraclough y Gorski, 1961; Lobl y Maenza, 1977). Por ejemplo, en cerdas neonatales la androgenización resulta en infertilidad anovulatoria (Ventanas y col., 1992). También, cuando neonatas caninas fueron inyectadas con un andrógeno durante 3 meses luego del parto, se retrasó la pubertad, y las mismas desarrollaron síndrome anovulatorio y una falta completa de receptividad sexual al macho (Beach y col., 1983). En el caso de ratas tratadas con testosterona (T) durante los primeros días de vida se observó que presentaban atrofia ovárica (Pinilla y col., 1993). El tratamiento con andrógenos postnatales puede constituir una estrategia para el control de la reproducción indeseada en felinos, dado que resulta en

esterilidad anovulatoria en la hembra adulta, la cual deriva de una liberación tónica de gonadotrofinas, también altera la función uterina normal y el comportamiento sexual.

A nuestro conocimiento, no existen estudios previos utilizando andrógenos en gatos domésticos durante el periodo crítico postnatal del desarrollo sexual, con fines contraceptivos. Con el objetivo de confirmar la hipótesis de que en los gatos domésticos, al igual que lo que ocurre en otros mamíferos (Barraclough y Gorski, 1961; Beach y col., 1983; Ventanas y col., 1992), los andrógenos exógenos inducen esterilidad si son administrados durante el período crítico del desarrollo sexual postnatal, en el presente capítulo se describen los efectos reproductivos clínicos, hormonales e histológicos de la administración postnatal de un andrógeno. Asimismo, se evalúa la seguridad clínica del tratamiento. Para los estudios realizados fue seleccionado como disruptor endocrino el enantato de testosterona (ET), un andrógeno sintético de acción prolongada (Plumb, 2006).

## **Materiales y métodos**

### ***Animales***

Para el presente estudio se utilizaron 13 hembras felinas, hermanas de camada, desde el nacimiento hasta su pubertad o la edad de 18 meses. Los animales nacieron y se mantuvieron, a lo largo de todo el estudio, dentro de nuestra colonia experimental, alojados conforme a las normas internacionales del Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Al nacimiento los cachorros felinos fueron sexados, de acuerdo a la distancia anogenital, e identificados. Durante las primeras 6 semanas de vida los animales se ubicaron en la maternidad junto con sus madres y luego del destete se introdujeron al plantel general donde permanecieron sueltos en ambientes de 3 x 4 metros, enriquecidos para su distracción. A partir del primer mes de vida se les comenzó a ofrecer alimento balanceado para cachorros y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron expuestos a un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

### ***Diseño experimental y protocolo farmacológico***

Las hembras felinas, hermanas de camada, fueron asignadas aleatoriamente dentro de las primeras 24 horas de nacidas a uno de los siguientes tratamientos:

-ET 12,5 mg total (Testoviron Depot 250, Bayer, Argentina) subcutáneo (sc) en la cara interna del muslo izquierdo (ET;  $n = 8$ )

-Placebo 0,05 ml aceite de maíz sc en la cara interna del muslo izquierdo (PL;  $n = 5$ )

La dosis se seleccionó en base a estudios piloto previos en felinos, basados en el modelo animal de Barraclough y Gorski (1961).

### ***Seguimiento***

El seguimiento de los animales se extendió hasta la aparición de los primeros signos de la pubertad. El seguimiento incluyó aspectos físicos, comportamentales y endocrinológicos. Las cachorras se observaron diariamente durante un mínimo de 2 horas a fin de detectar la aparición del comportamiento sexual típico (Johnston y col., 2001) y/o de algún efecto adverso. Semanalmente se examinaron los genitales externos y las glándulas mamarias, así como también, todas las hembras fueron pesadas una vez a la semana como indicador de crecimiento somático.

### ***Citología vaginal***

Como bioprueba indirecta de las concentraciones estrogénicas, a partir de los 3 meses de edad, se tomaron muestras citológicas vaginales 3 veces por semana, utilizando hisopos óticos embebidos en solución fisiológica. Las muestras fueron coloreadas con Tinción 15 (Biopur®, Sta Fe, Argentina) y se analizaron e interpretaron de acuerdo a Mills y col. (1979).

La pubertad fue definida como la aparición del comportamiento sexual típico del estro para la especie, sumado a la presencia de más del 80% de células superficiales queratinizadas en la citología vaginal (Johnston y col., 2001).

***Recolección de materia fecal, extracción húmeda de esteroides sexuales fecales y determinaciones hormonales***

A todas las hembras se les tomó muestras de materia fecal para la medición de los esteroides sexuales  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>) y T. Dichas muestras fueron obtenidas semanalmente hasta la aparición de la pubertad. Durante las primeras 5 semanas de vida fue necesario realizar estimulación rectal para su obtención. Los animales de mayor edad fueron encerrados en gateras individuales con alimento y agua hasta su defecación. Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento. El procesamiento de la materia fecal se realizó a través del método descrito por Brown y col. (2008), con algunas modificaciones realizadas por Risso y col. (2010 a, b). Brevemente, las muestras fueron homogenizadas, luego se tomó una alícuota de 250 mg de cada una, a las que se les agregó 5 ml de alcohol etílico absoluto, y posteriormente se las agitó, primero a mano y luego con vórtex, durante un minuto. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, y del sobrenadante se extrajeron 200 µl que fueron colocados en un eppendorf para dejarlo evaporar durante 48 hs hasta su sequedad. El residuo seco fue resuspendido con 200 µl de buffer de esteroides para su posterior medición. Finalmente, los metabolitos fecales fueron determinados por electroquimioluminiscencia (Elecsys Estradiol II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los resultados se expresaron en valores de peso húmedo (ng/g).

***Prueba de fertilidad in vivo, diagnóstico de ovulación y preñez***

Cuando las hembras alcanzaron la pubertad fueron expuestas para su monta a un gato adulto, de fertilidad conocida, durante todo el periodo del estro. Los apareamientos fueron observados y/o diagnosticados por la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales. Veintiún días después de finalizado el celo se tomaron muestras de sangre por venopunción periférica para la detección de ovulación, mediante la determinación sérica de progesterona (P<sub>4</sub>) por electroquimioluminiscencia (Elecsys Progesterone II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; P<sub>4</sub> > 5 ng/ml). Finalmente, en las



hembras que ovularon, fue realizado el diagnóstico de gestación por ultrasonografía (Mattoon y Nyland, 1995).

### ***Ovariohisterectomía***

Luego del diagnóstico de gestación, todas las hembras fueron ovariohisterectomizadas. Durante la cirugía, los animales se premedicaron con sulfato de atropina (Sufato de Atropina, John Martin; 0,04 mg/kg, vía sc), maleato de acepromacina (Acedan, Holiday; 0,03 mg/ kg vía sc) y butorfanol (Torbutol Plus, Fort Dodge; 0,2 mg/kg, vía intramuscular). La anestesia se indujo con tiopental sódico (Pentovet TM, Richmond; 8 mg/kg, vía endovenosa). Una vez que los gatos fueron intubados por vía endotraqueal, la anestesia se mantuvo con isoflurano y oxígeno en un sistema cerrado. Se realizó una laparotomía por línea media para la escisión de los ovarios y el útero (Arnold, 2002). Después de la cirugía se administró ketoprofeno (Ketofen®, Fort Dodge; 1 mg /kg) vía sc (una vez) y luego por vía oral cada 24 horas durante 4 días consecutivos. Finalmente todas las hembras fueron entregadas en adopción.

### ***Examen macroscópico e histológico de ovarios y útero***

Inmediatamente después de la escisión quirúrgica del tracto genital, los ovarios y el útero se evaluaron macroscópicamente y se pesaron. Para el examen histológico los ovarios fueron colocados en el fijador de Bouin durante 12 horas, y finalmente en alcohol 70 % hasta ser procesados en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 5 µm de espesor, los que posteriormente fueron montados, desparafinados en xylol y rehidratados en soluciones graduadas de etanol y finalmente coloreados con hematoxilina-eosina.

Veinte imágenes con un aumento de 20X fueron capturadas por cada ovario y se determinó luego el número de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales, de cuerpos lúteos y de folículos atresicos por milímetro cuadrado (Reggiani y col., 2012). Los folículos fueron clasificados bajo el sistema propuesto por Bristol-Gould y Woodruff (2006) en: primordiales (ovocito pequeño rodeado por una capa simple de epitelio plano), primarios (ovocito de mayor tamaño rodeado por una capa de epitelio

cúbico), secundarios (con 2 o más capas de células de la granulosa y teca), antrales (presencia de espacio antral con fluido folicular, células de la granulosa formando un muro, *cúmulus oophorus* y dos o más capas de células tecales), o atrésico (con presencia de degeneración de las células de la granulosa, el líquido folicular con detritos celulares y formación de vacuolas en el interior del ovocito; Hernandez y col., 2010; van Wezel y col., 1999).

El útero, una vez extirpado, fue seccionado longitudinalmente para su inspección interna. Se realizaron cortes de 0,5-1 cm, desde un punto medio entre la bifurcación externa y la punta de cada cuerno uterino. Las muestras obtenidas fueron procesadas para su estudio histológico de modo idéntico al descrito para los ovarios. El útero fue examinado con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de glándulas endometriales. Mediante planimetría fue medida el área ocupada por las glándulas uterinas por micrómetro cuadrado ( $\mu\text{m}^2$ ), sobre el área total de cada campo microscópico. La altura del epitelio uterino glandular y luminal ( $\mu\text{m}$ ) se evaluó contando un número de 100 células en un total de 10 imágenes por útero, tomadas con un objetivo de 10x, mientras que el espesor del miometrio ( $\mu\text{m}$ ) se determinó en un total de 4 imágenes por útero, tomadas con un objetivo a 4x.

Las imágenes histológicas se obtuvieron desde un microscopio óptico (Olympus BX50) con los objetivos de 4X, 10X y 20X, a través de una cámara de video conectada al microscopio (Sony DXC 151, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits. Las imágenes se analizaron a través del software Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics (Silver Spring, MA, USA).

### ***Análisis estadístico***

Las diferencias cuantitativas y cualitativas entre los grupos ET y PL fueron determinadas por medio de Fisher's Exact Test y Test de Students, respectivamente. Las concentraciones de T y  $17\beta\text{-E}_2$  fecal fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, seguido por la prueba de comparación de Tukey. Los resultados fueron expresados como la (media  $\pm$  SEM), y el nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$  (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

## Resultados

La edad ( $34 \pm 2,6$  versus (vs)  $33 \pm 2,3$  semanas;  $p > 0,1$ ) y el peso corporal ( $2,92 \pm 0,7$  vs.  $2,76 \pm 0,9$  kg;  $p > 0,1$ ; **Figura 1**) a la pubertad no presentaron diferencias significativas entre los grupos ET y PL.

Las concentraciones de T fecales fueron diferentes entre los tratamientos a lo largo de las semanas ( $p < 0,05$ ), siendo mayor durante las primeras 2 semanas de vida en el grupo ET ( $p < 0,01$ ; **Figura 2**).

Por el contrario, las concentraciones fecales de  $17\beta\text{-E}_2$  variaron durante el estudio, sin diferencias entre los tratamientos ( $p > 0,1$ ). En ambos grupos, las concentraciones de  $17\beta\text{-E}_2$  fueron elevadas durante las primeras 5 semanas postnatales ( $p > 0,1$ ), luego se mantuvieron en niveles basales hasta las 3 a 4 semanas previas a la pubertad, cuando comenzaron a incrementarse gradualmente (**Figura 3**).

Todas las hembras tratadas con ET presentaron agrandamiento de la vulva y del clítoris con exposición del mismo entre las semanas 3 y 13. A posterioridad de este período mostraron un tamaño y desarrollo normal de los genitales. En 1 de las 8 gatas tratadas con ET fue observada la presencia de nódulos mamarios transitorios ( $p > 0,1$ ). En este caso, dos nódulos de 1,8 cm de diámetro aparecieron en la glándula mamaria inguinal y pectoral izquierda en la semana 27, los que fueron disminuyendo gradualmente de volumen hasta no ser palpables, en la semana 39.

Una gata del grupo ET presentó comportamiento de monta antes de alcanzar la pubertad. El resto de las hembras mostraron un comportamiento estral normal, siendo receptivas al macho ( $p > 0,1$ ), por lo que se aparearon en repetidas ocasiones durante el estro de la pubertad.

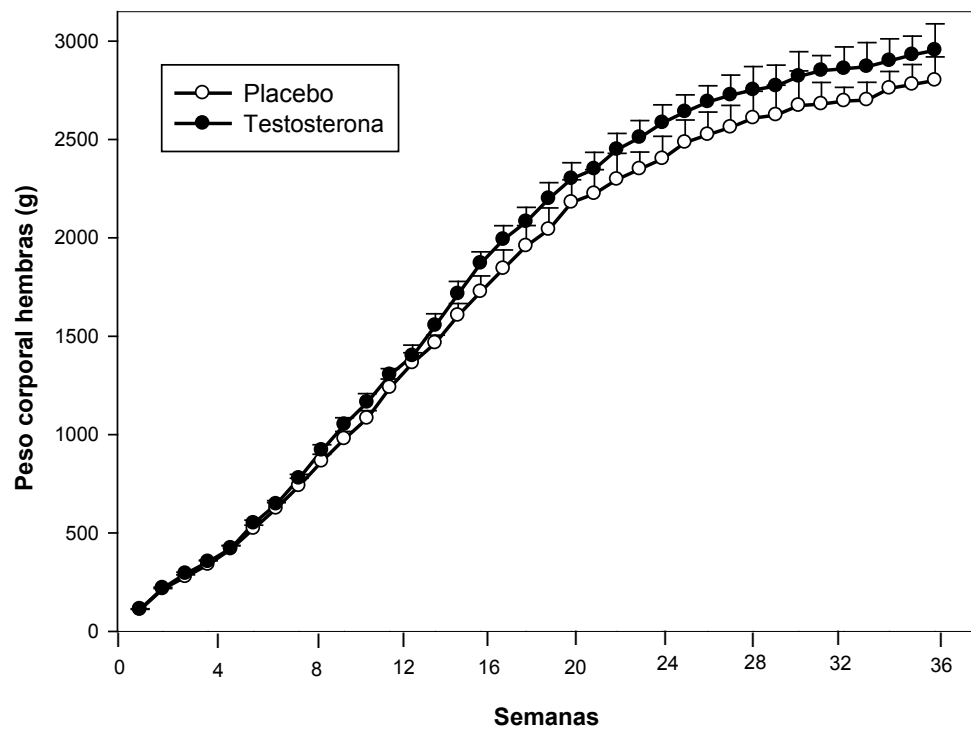
Todas las hembras del grupo PL (5/5) habían ovulado y 3 de ellas estaban preñadas cuando se realizaron las evaluaciones, sin embargo la ovulación ocurrió solo en 2 de las 8 hembras del grupo ET ( $p < 0,05$ ; **Figura 4**), estando 1 de ellas preñada en el momento de la evaluación. En ambos grupos la gestación progresó normalmente hasta el momento de la ovariectomía, cuando el examen de los úteros extirpados reveló 4 a 5 vesículas gestantes.

En la evaluación macroscópica de los ovarios se encontraron folículos en crecimiento y cuerpos lúteos, en los animales anovulatorios y los que ovularon, respectivamente. El peso de los ovarios no presentó

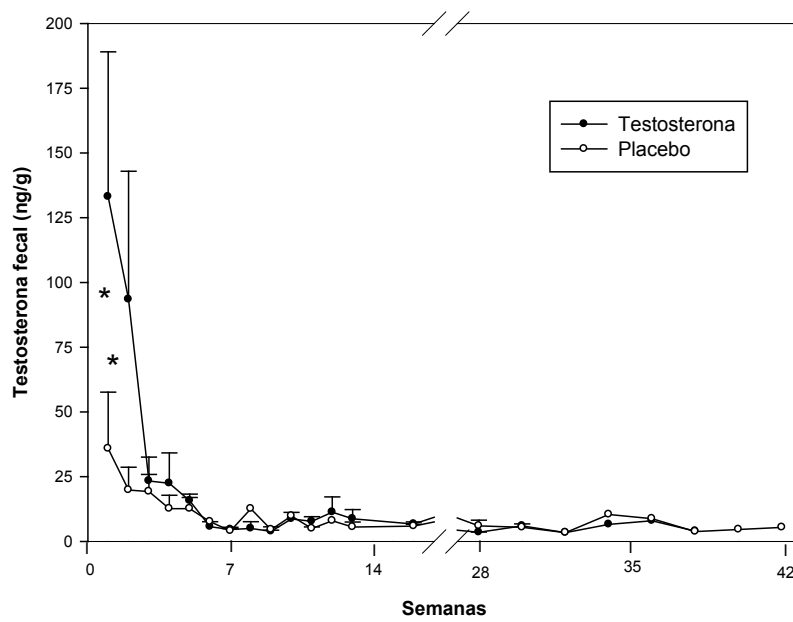
diferencias significativas entre los grupos ET y PL ( $0,17 \pm 0,0$  vs.  $0,16 \pm 0,0$  g;  $p > 0,1$ ). De manera similar, no se observaron otras diferencias macroscópicas ni histológicas entre los grupos ET y PL para las variables en estudio (**Tabla 1**).

Al examen macroscópico externo e interno el útero se mostró normal en todas las hembras, sin embargo, en una gata del grupo ET, que estaba en celo en el momento de la cirugía, presentó hiperemia abdominal y un ligero aumento del sangrado. En esta gata, la inspección uterina reveló un endometrio más engrosado que en el resto de las hembras.

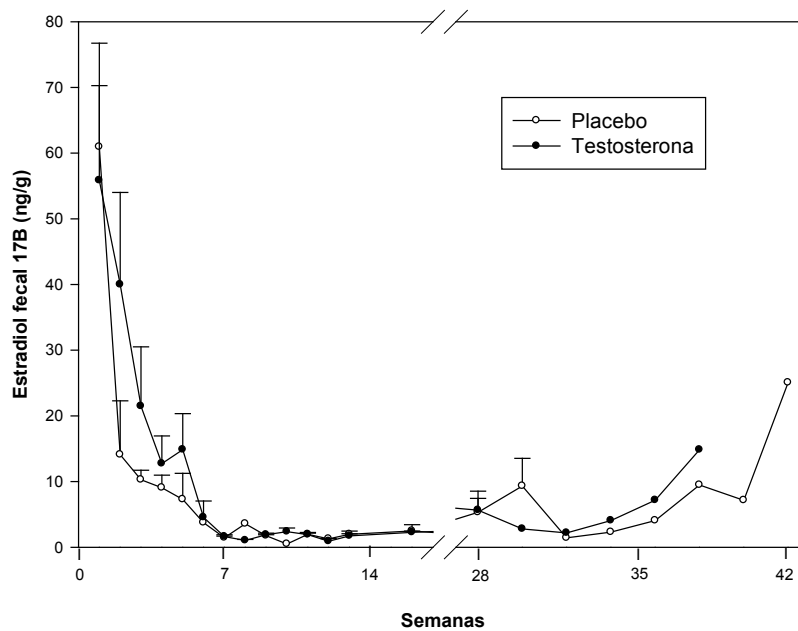
La evaluación microscópica del útero reveló que el área ocupada por las glándulas uterinas, por  $\mu\text{m}^2$  de endometrio, fue menor en hembras del grupo ET que en las del grupo PL ( $0,34 \pm 0,01$  vs.  $0,49 \pm 0,03$ ;  $p < 0,01$ ; **Figura 5**). Por el contrario, el área ocupada por estroma, por  $\mu\text{m}^2$  de endometrio, fue mayor en hembras ET ( $0,64 \pm 0,01$  vs.  $0,50 \pm 0,03$ ;  $p < 0,01$ ). La altura del epitelio glandular uterino ( $13,89 \pm 0,29$  vs.  $21,43 \pm 1,10$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$ ) y del epitelio luminal uterino ( $8,09 \pm 0,39$  vs.  $9,44 \pm 0,42$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ) fue menor en ET que en el grupo PL. Contrariamente, el espesor del miometrio no tuvo variaciones entre ambos grupos ( $286,43 \pm 8,23$  vs.  $298,36 \pm 8,62$   $\mu\text{m}$ ;  $p > 0,05$ ; **Tabla 2**).



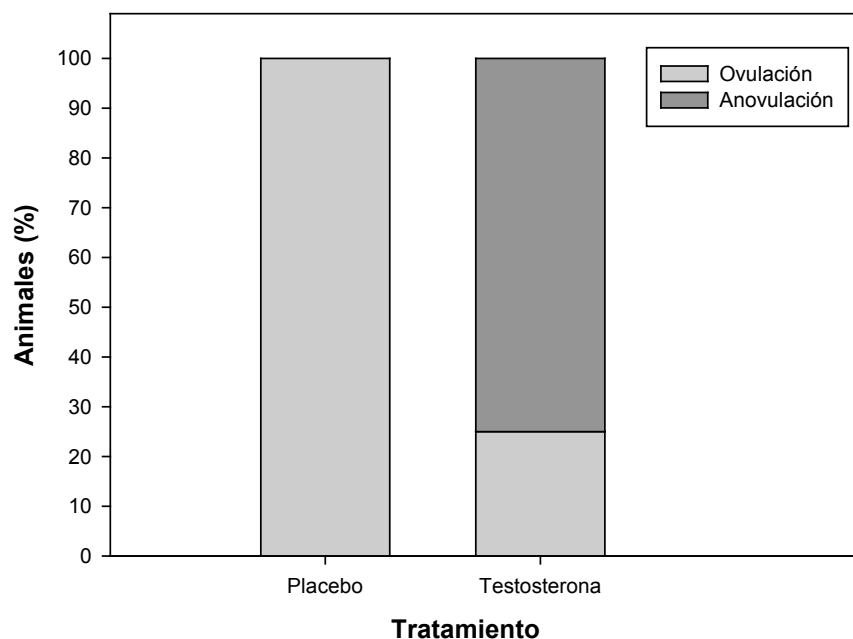
**Figura 1:** Peso (media $\pm$ SEM) de 13 hembras felinas postnatas, tratadas dentro de las primeras 24 horas de vida con enantato de testosterona (ET  $n=8$ ) o placebo (PL  $n=5$ ) y observadas hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. No se hallaron diferencias entre los grupos ( $p>0,1$ ).



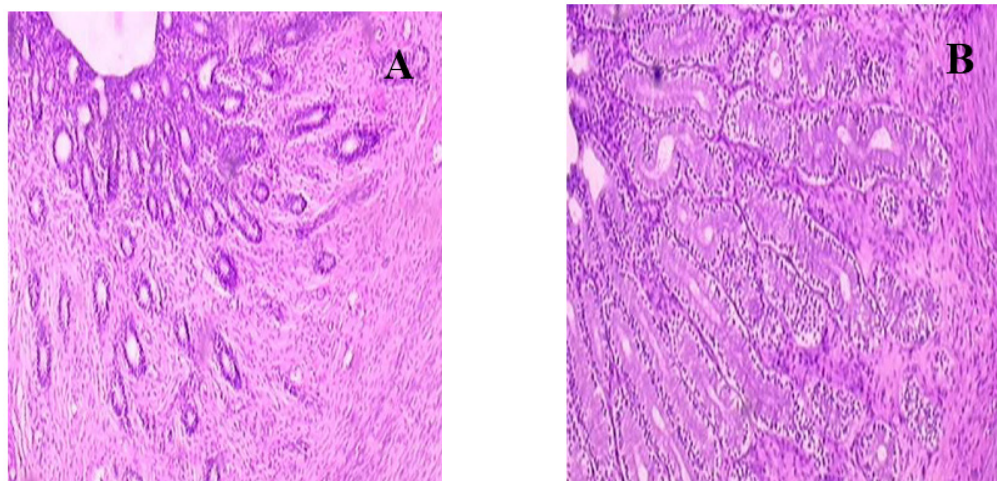
**Figura 2:** Testosterona fecal (media $\pm$ SEM) de las hembras felinas postnatas de la Figura 1. Los asteriscos sobre las semanas 1 y 2 representan diferencias significativas ( $p < 0,01$ )



**Figura 3:** 17 $\beta$  -Estradiol fecal (media $\pm$ SEM) de las hembras felinas postnatas de la Figura 1. No se hallaron diferencias entre los grupos ( $p > 0,1$ ).



**Figura 4:** Porcentaje de las hembras de la Figura 1 que ovularon. Se hallaron diferencias entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Útero de las gatas ET y PL descrito en la Tabla 2. Nótese menos glándulas endometriales en la hembra tratada con enantato de testosterona (A) en comparación con el grupo placebo (B;  $p < 0,01$ ). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (10X).

**Tabla 1:** Parámetros ováricos macroscópicos e histológicos (media $\pm$ SEM) de hembras tratadas en la etapa postnatal con enantato de testosterona (ET n=8) o placebo (PL n=5). No se hallaron diferencias entre los tratamientos ( $p>0,05$ ).

Parámetros	Enantato de testosterona	Placebo
Largo ovárico (cm)	1,02 $\pm$ 0,0	0,95 $\pm$ 0,0
Alto ovárico (cm)	0,58 $\pm$ 0,0	0,65 $\pm$ 0,0
Peso ovárico (g)	0,16 $\pm$ 0,0	0,17 $\pm$ 0,0
Volumen ovárico (cm <sup>3</sup> )	0,17 $\pm$ 0,0	0,20 $\pm$ 0,0
Folículos primordiales/mm <sup>2</sup>	35,13 $\pm$ 15,0	38,67 $\pm$ 7,7
Folículos primarios/mm <sup>2</sup>	6,80 $\pm$ 1,42	10,62 $\pm$ 1,8
Folículos secundarios/mm <sup>2</sup>	0,95 $\pm$ 0,2	1,91 $\pm$ 0,7
Folículos antrales/mm <sup>2</sup>	0,24 $\pm$ 0,0	0,08 $\pm$ 0,0
Folículos atrésicos/mm <sup>2</sup>	3,80 $\pm$ 0,6	3,64 $\pm$ 0,7

**Tabla 2:** Parámetros histológicos en el útero (media $\pm$ SEM) de las hembras de la Tabla 1. Los asteriscos en una misma fila indican diferencias significativas \* ( $p<0,05$ ) o \*\* ( $p<0,01$ ) entre los grupos.

Parámetros	Enantato de testosterona	Placebo
Área ocupada por glándulas ( $\mu\text{m}^2$ )	0,34 $\pm$ 0,01**	0,49 $\pm$ 0,03**
Área ocupada por estroma ( $\mu\text{m}^2$ )	0,64 $\pm$ 0,01**	0,50 $\pm$ 0,03**
Altura del epitelio uterino ( $\mu\text{m}$ )	8,09 $\pm$ 0,39*	9,44 $\pm$ 0,42*
Altura del epitelio glandular ( $\mu\text{m}$ )	13,89 $\pm$ 0,29**	21,43 $\pm$ 1,0**
Espesor del miometrio (um)	286,43 $\pm$ 8,23	298,36 $\pm$ 8,62



## Discusión

Si bien los efectos de la androgenización postnatal se han reportado en varias especies de mamíferos, incluyendo los caninos (Barracclough y Gorski, 1961; Beach y col., 1983; Jackson y col., 2013; Lobl y Gorski, 1974; Ventanas y col., 1992), no se conocen estudios que describan el efecto reproductivo de una dosis suprafisiológica de andrógenos postnatales en la hembra felina. Así, en este estudio la administración de una única dosis de T en las gatas no alteró la tasa de crecimiento, la edad de la pubertad, como así tampoco el comportamiento estral ni la receptividad al macho. De manera similar, en ratas androgenizadas neonatalmente el peso corporal no presentó diferencias significativas con el grupo control (Almirón y col., 1984).

En general, se acepta que la T, en el periodo postnatal temprano, puede suprimir, de forma permanente, el desarrollo del comportamiento reproductivo femenino, no obstante esta premisa no resultó consistente con los hallazgos de un estudio previo, en el cual la receptividad sexual en cerdas no se vio afectada por estos tratamientos postnatales (Ford y Christenson, 1987). En contraste, el comportamiento sexual normal fue suprimido en roedores y perras androgenizadas neonatalmente (Beach y col., 1983; Gogan y col., 1980; Thomas y col., 1983). Estas características en la respuesta conductual a la T postnatal tal vez puedan deberse a las distintas dosis utilizadas en las diferentes especies.

El aumento de la T fecal durante las dos primeras semanas postnatales en el grupo ET justifica el efecto de este tratamiento sobre los hallazgos físicos y comportamentales posteriores. Esta elevación, asimismo, define el “periodo crítico” de diferenciación sexual y reproductiva en la especie. Por otra parte, las concentraciones de  $17\beta$ -E<sub>2</sub> fecal no se vieron afectadas por el tratamiento con andrógenos. En ambos grupos, las concentraciones de  $17\beta$ -E<sub>2</sub> elevadas durante las primeras 5 semanas postnatales podrían ser debidas a un origen endógeno, de acuerdo a lo descripto por Faya y col. (2013), en gatas postnatales.

Las anomalías transitorias en los genitales externos y el comportamiento de monta observado en todas las hembras del grupo ET son evidencia clara de los efectos periféricos de la T administrada.

Igualmente, era predecible que ocurrieran estos cambios, de acuerdo a reportes previos en otras especies, androgenizadas neonatalmente (Brown y col., 1999; Morali y col., 1985).

De acuerdo con lo que se ha descripto ampliamente en otros mamíferos (Jackson y col., 2013), la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico probablemente se vio afectada en la mayoría de las hembras, dado que el 75% de las gatas del grupo ET resultaron anovulatorias. Se supone que la anovulación es el resultado de un trastorno inducido por los andrógenos en el hipotálamo postnatal, con el subsiguiente cambio en el patrón de liberación de la hormona luteinizante desde la glándula pituitaria (Barraclough, 1961; Wagner y col., 1966). Este hecho sostiene la hipótesis de que el hipotálamo es sensible, al menos en parte, a la programación por esteroides postnatales en especies atriciales como los felinos.

Conforme a lo descripto para otros disruptores endócrinos en gatos postnatales (Carranza y col., 2014), las diferencias en la respuesta individual a los tratamientos postnatales pueden explicar los hallazgos del presente estudio. Cabe señalar que el efecto de la dosis usada se ha descripto anteriormente para los andrógenos aromatizables y no aromatizables en la inducción del síndrome anovulatorio en ratas (Arai y col., 1981; Gorski y Barraclough, 1963). Aunque una dosis mayor de T podría haber disminuido o eliminado la variabilidad en el efecto anovulatorio, la posibilidad de utilizar una dosis mayor no parece ser factible, ya que se verían incrementados los riesgos de aparición de efectos adversos.

Los folículos en crecimiento anovulatorios, con hipersecreción de estrógenos y con la subsiguiente hiperestrogenemia, podrían haber dado lugar a la inflamación presente, hemorragias, e hiperplasia endometrial que fue observada en una de las hembras tratadas con ET, cuando se esterilizó durante el celo. Estos hallazgos abdominales fueron similares, en algunos aspectos, a los descriptos para el síndrome de hiperestimulación ovárica en mujeres, el cual se caracteriza por la aparición de múltiples quistes ováricos y consecuente hiperestrogenemia (Jones y col., 1987).

Los nódulos mamarios observados en una de las hembras del grupo ET no fueron examinados histopatológicamente, no obstante su presencia transitoria sugiere una etiología no neoplásica. Análogamente, en otro trabajo, el tratamiento postnatal con dihidrotestosterona, dió lugar a la

estimulación y desarrollo mamario en edades avanzadas en ratones hembras (Yanai y col., 1981). Se debe tener también en cuenta que los efectos colaterales a largo plazo, no deben ser descartados, si bien no fueron estudiados en el desarrollo del presente experimento.

El tratamiento con T en hembras felinas postnatas, resultó en una reducción del área ocupada por las glándulas endometriales y en un menor desarrollo de las células del epitelio glandular y luminal uterino. Resultados equivalentes se han descripto en ratas androgenizadas neonatalmente (Arutiunian y col., 1987) como asimismo en perras tratadas neonatalmente con  $P_4$ , otro esteroide sexual (Wilborn y col., 2014). Dado que para el establecimiento y mantenimiento de la preñez se requieren glándulas endometriales normales, es probable que exista una concomitante infertilidad uterina en las hembras anovulatorias tratadas con ET, no obstante este aspecto no fue estudiado aún. Solo se pudo determinar un funcionamiento uterino normal en una de las hembras del grupo ET que resultó preñada. Contrariamente con los hallazgos en ratas postnatales androgenizadas (Lobl y Maenza, 1977), en el presente trabajo no se han encontrado variaciones en el espesor del miometrio.

Se concluye que una única dosis suprafisiológica de ET administrada en gatas postnatas, produjo una alta proporción de animales con infertilidad anovulatoria y frecuentes anormalidades histológicas endometriales. Además, este protocolo farmacológico puede predisponer a efectos secundarios físicos leves y reversibles. Se requiere un mayor avance en el conocimiento sobre el tema antes de que estos protocolos farmacológicos puedan ser ampliamente recomendados como estrategia anticonceptiva en hembras felinas.

## Referencias

1. Almirón I, Domené H, Chemes HE. Hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. *J Androl*. 1984; 5: 235–42.
2. Arai Y, Yamanouchi K, Mizukami S, Yanai R, Shibata K, Nagasawa H. Induction of anovulatory sterility by neonatal treatment with 5 beta-dihydrotestosterone in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1981; 96: 439–43.
3. Arnold E. Ovary and uterus. En: Slatter D. (Ed.). *Textbook of Small Animal Surgery*. 3ra ed. Ed Saunders, RW. Philadelphia, 2002; p. 1496–98.
4. Arutiunian NA, Prořimina FI, Savchenko ON, Skopichev VG, Sekretareva EN. Morphological characteristics of the uterine reaction of androgenized rats in the neonatal period to the administration of sex steroids. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 1987; 33: 59–61.
5. Barraclough, CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology*. 1961; 68: 68–79.
6. Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. *Behav Neural Biol*. 1983; 38: 1-31.
7. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat *Felis catus*. *Theriogenology*. 2006; 66: 5–13.
8. Brown GR, Nevison CM, Fraser HM, Dixon AF. Manipulation of postnatal testosterone levels affects phallic and clitoral development in infant rhesus monkeys. *Int J Androl*. 1999; 22: 119–28.
9. Brown J, Wakter S, Steinman K. *Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and nondomestic species*. Conservation and research center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA, 2008; p. 62.
10. Carranza A, Faya M, Merlo ML, Batista P, Gobello C. Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. *Theriogenology*. 2014; 1: 138–43.

11. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17b and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology*. 2013; 80: 584-6.
12. Ford JJ, Christenson RK. Influences of pre and postnatal testosterone treatment on defeminization of sexual receptivity in pigs. *Biol Reprod*. 1987; 36: 581-7.
13. Gogan F, Beattie IA, Hery M, Laplante E, Kordon D. Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon oestradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J Endocrinol*. 1980; 85: 69-74.
14. Gorski RA. Lesion effects on hypothalamohypophyseal function. *Neurosci Res Program Bull*. 1971; 9: 263-8.
15. Gorski RA, Barraclough CA. Effects of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology*. 1963; 73: 210-6.
16. Harris GW, Naftolin F. The hypothalamus and control of ovulation. *Br Med Bull*. 1970; 26: 3-9.
17. Hernandez J, Suarez-Sanchez J, Perez-Martinez M. Morphometric characteristics of female reproductive organs of New Zealand rabbits with different body weight in peripuberal period of transition. *Vet Mex*. 2010; 41: 211-8.
18. Jackson LM, Mytinger A, Roberts EK, Lee TM, Foster DL, Padmanabhan V, Jansen HT. Developmental Programming: postnatal steroids complete prenatal steroid actions to differentially organize the GnRH surge mechanism and reproductive behavior in female sheep. *Endocrinology*. 2013; 154: 1612-23.
19. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. Canine and Feline. *Theriogenology*. Saunders, WB. Philadelphia. 2001; p. 592.
20. Jones HM, Vernon MW, Rush ME. Systematic studies invalidate the neonatally androgenized rat as a model for polycystic ovary disease. *Biol Reprod*. 1987; 36: 1253-65.
21. Lobl RT, Gorski RA. Neonatal intrahypothalamic androgen administration: the influence of dose and age on androgenization of female rats. *Endocrinology*. 1974; 94: 1325-30.

22. Lobl RT. Androgenization: alterations in the mechanism of oestrogen action. *J Endocrinol.* 1975; 66: 79–84.
23. Lobl RT, Maenza RM. The ontogeny of uterine pathology and pathophysiology following neonatal androgen administration. *Biol Reprod.* 1977; 16: 182–9.
24. Mattoon JS, Nyland TG. Ultrasonography of the genital system. En: Nyland JS, Mattoon TG. *Veterinary Diagnostic Ultrasound.* Ed Saunders, WB. Philadelphia, 1995; p. 141–64.
25. Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biol Reprod.* 1992; 46: 1080-5.
26. Mills J, Valli V, Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *CanVet J.* 1979; 20: 95-101.
27. Morali G, Carrillo L, Beyer C. Neonatal androgen influences sexual motivation but not the masculine copulatory motor pattern in the rat. *Physiol Behav.* 1985; 34: 267–75.
28. Pinilla L, Trimiño E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytán F, Aguilar E. Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. *J Reprod Fertil.* 1993; 97: 13-20.
29. Plumb DC. *Manual de farmacología veterinaria.* 5ta. ed. Buenos Aires. Argentina. Ed Inter-Médica. 2006; p. 680-82.
30. Reggiani P, Barbeito C, Zuccolilli G, Cónsole G, Flamini A, Dardenne M, Goya R. Neonatal thymulin gene therapy prevents ovarian dysgenesis and attenuates reproductive derangements in nude female mice. *Endocrinology.* 2012; 153: 3922-8.
31. Risso A, De la sota P, Garcia P, Diaz J, Corrada Y, Blanco P, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de progesterona fecal en el gato doméstico. *Analecta Vet.* 2010a; 30: 5-8.
32. Risso A, Iglesias M, García Romero G, Valiente C, Diaz J, Corrada Y, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico: reporte preliminar. *InVet.* 2010b; 12: 53-8.

33. Thomas DA, Howard SB, Barfield RJ. Influence of androgen on the development of sexual behavior in the rat. II. Time and dosage of androgen administration during the neonatal period and masculine and feminine copulatory behavior in females. *Horm Behav.* 1983; 17: 308–15.
34. van Wezel I, Dharmarajan A, Lavranos T, Rodgers R. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology.* 1999; 140: 2602-11.
35. Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. *Exp Clin Endocrinol.* 1992; 99: 119-22.
36. Wagner JW, Erwin W, Critchlow V. Androgen sterilization produced by intracerebral implants of testosterone in neonatal female rats. *Endocrinology.* 1966; 79: 1135–42.
37. Wilborn RR, Wiley AA, Brennan KI, Johnson AK, Fraser NS, Dujovne GA, Cooke PS, Bartol FF. Neonatal exposure to medroxyprogesterone acetate alters canine uterine development. *Theriogenology.* 2014; 6: 344.
38. Yanai R, Nagasawa H, Mori T, Nakajima Y. Long-term effects of perinatal exposure to 5 alpha-dihydrotestosterone on normal and neoplastic mammary development in mice. *Endocrinol Jpn.* 1981; 28: 231–4.

## CAPÍTULO II

### EFFECTO DEL DISRUPTOR ANDROGÉNICO ENANTATO DE TESTOSTERONA EN MACHOS FELINOS POSTNATOS

#### Introducción

Está ampliamente establecido que los machos mamíferos requieren una exposición “priming” a la testosterona (T) antes y después del nacimiento, para alcanzar un desarrollo reproductivo y comportamental sexual normal a la edad adulta (Schulz y col., 2004). Sin embargo, es posible afirmar que dosis elevadas de T, administradas durante periodos críticos del desarrollo, pueden producir alteraciones irreversibles de estos mecanismos. Así, Wilson y Wilson (1943) han reportado, por primera vez, lesiones estructurales y/o funcionales del aparato reproductor masculino, luego de la administración de andrógenos en el periodo neonatal temprano en ratas machos enteros. Esta alteración permanente del aparato genital masculino se puede explicar por los efectos centrales (hipotálamo-hipofisario) y periféricos (testículo y glándulas accesorias) de dosis suprafisiológicas de T exógena postnatal (Piacsek y col., 1984).

Así por ejemplo, en roedores machos androgenizados neonatalmente, el peso testicular y el diámetro de los túbulos seminíferos se redujeron (Almirón y col., 1984; Barañao y col., 1981; Compaa y col., 1991; Feigelson, 1986; Jacobsohn y Norgren, 1965; Piacsek y Hostetter, 1984; Vanderstichele y col., 1987), de la misma manera que el tamaño prostático, y de las vesículas seminales (Barraclough y Leathem, 1959; Feigelson, 1986; Piacsek y Hostetter, 1984). La esteroidogénesis testicular *in vitro* también disminuyó (Vanderstichele y col., 1987), y los roedores resultaron infértiles (Feigelson, 1986; Piacsek y Hostetter, 1984; Wilson y Wilson, 1943). La exposición neonatal a la T, asimismo, redujo el comportamiento sexual de las ratas macho (Diamond y col., 1973; Wilson y Wilson, 1943). De la misma forma, en cerdos machos androgenizados durante el periodo postnatal, se observó una



reducción del peso testicular, el diámetro de los túbulos seminíferos y los niveles de T (Ventanas y col., 1992).

Considerando los reportes previos, el tratamiento con andrógenos postnatales podría constituir una estrategia para el control de la reproducción indeseada en el gato doméstico, representando una opción, para la escasamente explorada, contracepción masculina. A nuestro conocimiento no existen trabajos utilizando andrógenos postnatales en felinos con fines contraceptivos.

Por lo expuesto, los objetivos del presente capítulo se focalizaron inicialmente en describir los efectos reproductivos clínicos, hormonales e histológicos de la administración postnatal de un andrógeno en felinos domésticos; en segundo lugar también se evalúa la seguridad clínica del tratamiento. El enantato de testosterona (ET), un andrógeno sintético de acción prolongada (Plumb, 2006) fue seleccionado como disruptor endocrino para el presente estudio.

## **Materiales y métodos**

### ***Animales***

En este trabajo se utilizaron un total de 10 machos felinos hermanos de camada desde el nacimiento hasta sus primeros signos de pubertad. Los animales nacieron y se mantuvieron a lo largo de todo el estudio, dentro de nuestra colonia experimental, alojados conforme a las normas internacionales del Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Al nacimiento, los gatos fueron sexados de acuerdo a la distancia anogenital, e identificados. Durante las primeras 6 semanas de vida estos animales se ubicaron en la maternidad con sus madres y luego del destete se introdujeron al plantel general, donde permanecieron sueltos en ambientes de 3 x 4 metros enriquecidos para su distracción. A partir del primer mes de vida se les comenzó a ofrecer alimento balanceado de cachorro y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron expuestos a un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

### ***Diseño experimental y protocolo farmacológico***

Los cachorros hermanos de camada fueron asignadas aleatoriamente dentro de las primeras 24 hs de nacidos a uno de los siguientes tratamientos:

-ET 12,5 mg total (Testoviron Depot 250, Bayer, Argentina) subcutáneo (sc) en la cara interna del muslo izquierdo (ET;  $n = 5$ )

-Placebo 0,05 ml aceite de maíz sc en la cara interna del muslo izquierdo (PL;  $n = 5$ )

La dosis se seleccionó en base a estudios piloto previos en felinos, basados en el modelo animal de Barraclough y Gorski (1961).

### ***Seguimiento***

El seguimiento de los animales se extendió hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. El seguimiento incluyó aspectos físicos, comportamentales y endocrinológicos. Los cachorros se observaron diariamente durante un mínimo de 2 horas a fin de detectar la aparición del comportamiento sexual típico (Johnston y col., 2001) y/o de algún efecto adverso.

Todos los machos se revisaron semanalmente a fin de detectar el momento de separación balano prepucial y la aparición de espículas peneanas (van den Dungen y col., 1989); además se midieron sus testículos en largo (L) y ancho (W) con el fin de obtener el volumen testicular ( $VT = L \times W^2 \times 0,52$ ; Lin y col., 2009). Además, los animales se pesaron semanalmente como indicador de crecimiento somático. Se definió la aparición de la pubertad temprana cuando fue posible detectar la separación balano-prepucial completa y fueron visualizadas espículas peneanas completamente desarrolladas.

### ***Recolección de materia fecal, extracción húmeda de esteroides sexuales fecales y determinaciones hormonales***

En todos los machos se tomaron muestras de materia fecal para la obtención de T. Dichas muestras fueron obtenidas semanalmente hasta la aparición de la pubertad. Durante las primeras 5 semanas de vida fue necesario realizar estimulación rectal para su obtención. Los animales de mayor edad fueron

encerrados en gateras individuales con alimento y agua hasta su defecación. Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento. El procesamiento de la materia fecal se realizó a través del método descrito por Brown y col. (2008) con algunas modificaciones realizadas por Risso y col. (2010 a, b). Brevemente, las muestras fueron homogenizadas, luego se tomó una alícuota de 250 mg de cada una, a las que se les agregó 5 ml de alcohol étílico absoluto, y posteriormente se las agitó, primero a mano y luego con vórtex, durante un minuto. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, y del sobrenadante se extrajeron 200 µl que se colocaron en un eppendorf para dejarlo evaporar durante 48 hs hasta su sequedad. El residuo seco fue resuspendido con 200 µl de buffer de esteroides para su posterior medición. Finalmente, los metabolitos fecales fueron determinados por electroquimioluminiscencia (Elecsys Testo II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los resultados se expresaron en valores de peso húmedo (ng/g).

### ***Prueba de fertilidad in vivo***

Cuando los machos alcanzaron la pubertad fueron expuestos para su monta a una gata adulta de fertilidad probada y en estro. Se observaron los apareamientos y la libido de los animales, la que se clasificó como 0 en aquellos animales con ningún interés por el sexo opuesto, 1 para aquellos que presentaron poco interés y 2 para aquellos que tuvieron repetidas montas y el comportamiento típico de su género. Treinta días más tarde se le realizó el diagnóstico de gestación a la hembra por ultrasonografía (Mattoon y Nyland, 1995), confirmando así la fertilidad del macho.

### ***Gonadectomía y examen macroscópico de los testículos***

Se realizó anestesia general con xilacina (1-3 mg/kg intramuscular; Kensol®, Köing, Buenos Aires, Argentina) y ketamina (15-25 mg/kg intramuscular; Ketmin-50®; Holliday, Buenos Aires), complementada con la aplicación de lidocaína como anestésico local (0,5 ml máximo). Luego de las cirugías se inyectó ketoprofeno (1 mg/kg vía sc; Ketofen®, Fort Dodge) una vez, y luego se continuó administrando la misma droga por vía oral cada 24 horas durante 4 días.

Inmediatamente luego de la escisión quirúrgica de las gónadas (Boothe, 1993), éstas fueron pesadas (g), medidas (largo y ancho; cm), se calculó el volumen ( $\text{cm}^3$ ; Chen y col., 2008; Lin y col., 2009) y el índice gonadosomático (%; Franca y Godinho, 2003).

#### ***Lavado epididimal***

Después de la escisión de los testículos, se recuperaron espermatozoides de la cola del epidídimo seccionando esta última con hoja de bisturí y recogiendo el material obtenido en un portaobjeto atemperado. Posteriormente se evaluó la presencia de motilidad progresiva con un objetivo de 40X sobre una platina térmica (Soler y col., 2005). Finalmente, se observó la morfología espermática a través del extendido de una gota de semen sobre un portaobjetos. La misma se dejó secar y luego se tiñó con la coloración de Giemsa, observándose con un objetivo de 100x.

#### ***Estudio histomorfométrico testicular***

A los testículos se les realizó un corte longitudinal. Luego las gónadas fueron colocadas en el fijador de Bouin durante 12 horas, y finalmente en alcohol 70 grados hasta ser procesadas con el procedimiento de rutina con parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  que fueron montados, desparafinados en xylol y rehidratados con soluciones graduadas de etanol, y finalmente teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes histológicas fueron obtenidas desde un microscopio óptico (Olympus BX50) con los objetivos de 10X y 40X, a través de una cámara de video conectada (Sony DXC 151, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits. Las imágenes se analizaron a través del software Image Pro Plus. Se eligieron al azar 15 a 20 perfiles tubulares redondeados del testículo izquierdo de cada animal. En los túbulos seminíferos se midieron el diámetro tubular ( $\mu\text{m}$ ), eje mayor y eje menor ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro ( $\mu\text{m}$ ), y altura del epitelio germinal ( $\mu\text{m}$ ) en imágenes a 10X (Image Pro Plus). Por este método también se registró en el compartimiento intertubular el área nuclear de las células de Leydig ( $\mu\text{m}^2$ ) en imágenes a 40X (Image Pro Plus). El volumen ( $\text{cm}^3$ ) de los componentes testiculares se determinó por estereología mediante microscopia de luz usando una grilla de 441 puntos sobre las fotografías a 40X. Para ello se seleccionaron 15 campos

al azar (6615 puntos) para cada testículo donde se calculó la proporción de cada una de las estructuras sobre el volumen total de los testículos. Los puntos se clasificaron de la siguiente manera: espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas, espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig, compartimento intertubular, membrana basal y lumen. Además se calculó la longitud total de los túbulos seminíferos (metro; Franca y Godinho, 2003). Por último se calculó la siguiente proporción: espermátide redonda/espermatogonias (Berndtson y col., 1987).

### ***Análisis estadístico***

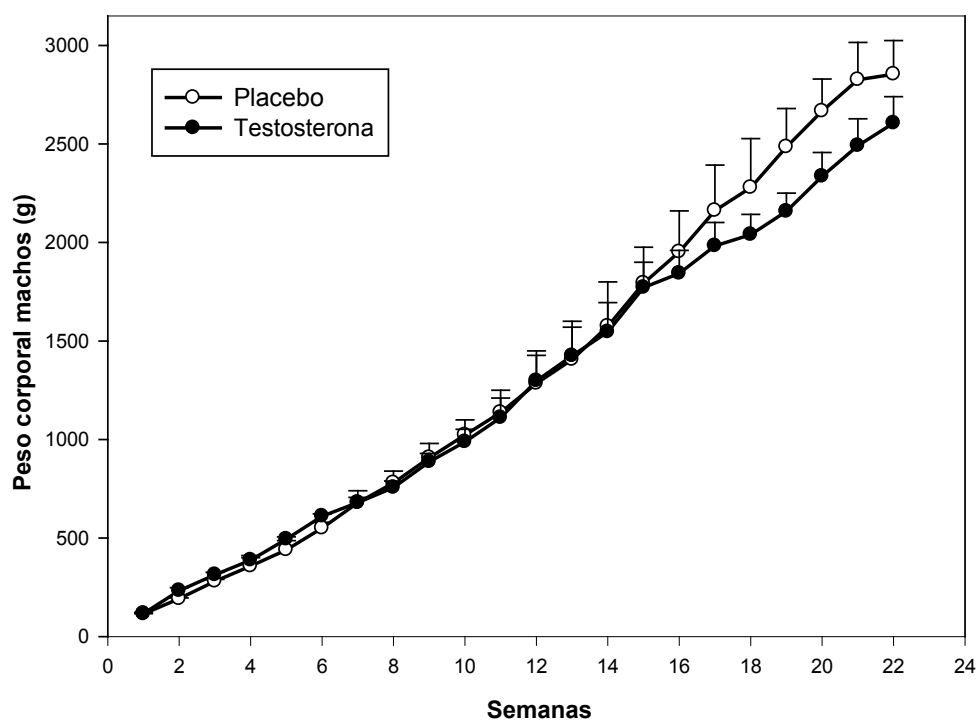
Las diferencias cuantitativas y cualitativas entre los grupos ET y PL se analizaron por medio de Fisher's Exact Test y Test de Students, respectivamente. Las concentraciones de T fecal fueron analizadas por un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, seguido por la prueba de comparación de Tukey. Los resultados fueron expresados como la (media  $\pm$  SEM) y el nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$  (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

### **Resultados**

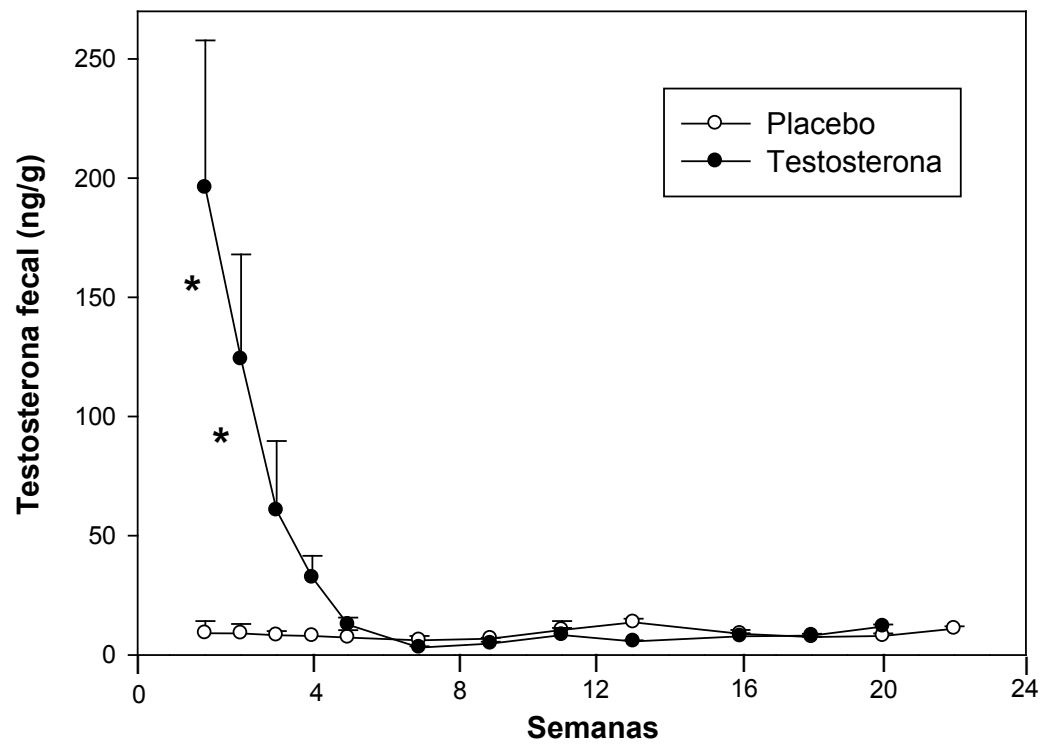
No se encontraron diferencias significativas para la edad ( $20,25 \pm 0,75$  versus (vs)  $21,5 \pm 1,5$  semanas;  $p > 0,1$ ) y el peso corporal ( $2,48 \pm 0,25$  vs.  $2,78 \pm 0,28$  kg;  $p > 0,1$ ; **Figura 1**) al alcanzar la pubertad entre los grupos ET y PL, respectivamente. No se observaron complicaciones clínicas ni alteraciones comportamentales a lo largo de todo el experimento ( $p > 0,1$ ).

La libido a la pubertad fue normal en todos los animales, no observándose diferencias entre los grupos ( $p > 0,1$ ), excepto en uno de los gatos del grupo ET que presentó una libido aumentada, tanto con las hembras como con los machos. Todos los animales del grupo ET como PL tuvieron servicios al alcanzar la pubertad, resultando fértiles cuatro (4/5) y cinco (5/5) en los mismos grupos ( $p > 0,1$ ).

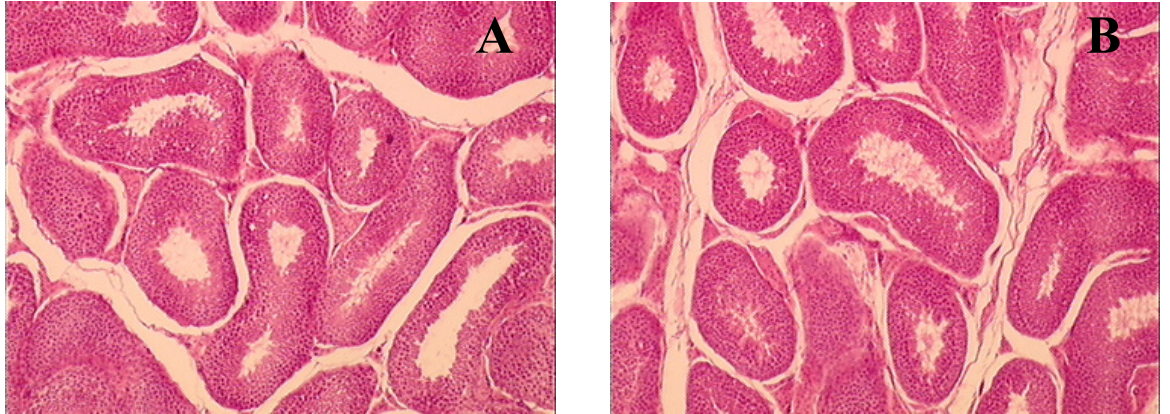
Todos los machos tuvieron motilidad y morfología normal de los espermatozoides epididimales, sin diferencias entre los tratamientos. En ambos grupos, las concentraciones de T fecales variaron en forma diferente a lo largo del periodo de estudio, siendo más elevada en los gatos del grupo ET durante las 2 primeras semanas postnatales ( $p<0,01$ ; **Figura 2**). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los parámetros testiculares macroscópicos ( $p>0,1$ ; **Tabla 1**), y microscópicos evaluados ( $p>0,1$ ; **Tabla 2**; **Figura 3 y 4**).



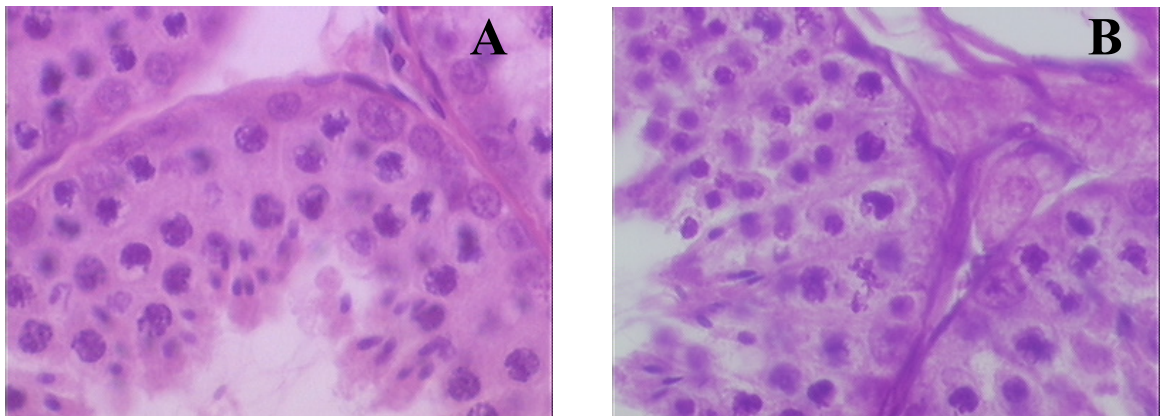
**Figura 1:** Peso (media $\pm$ SEM) de 10 machos felinos postnatos, tratados dentro de las primeras 24 horas de vida con enantato de testosterona (ET;  $n=5$ ) o placebo (PL;  $n=5$ ) y observados hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. No se hallaron diferencias entre los grupos ( $p>0,1$ ).



**Figura 2:** Testosterona fecal (media $\pm$ SEM) de los machos felinos postnatos de la Figura 1. Los asteriscos sobre las semanas 1 y 2 representan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 3:** Cortes histológicos de testículo de los gatos descritos en la Tabla 2. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (10X).



**Figura 4:** Cortes histológicos de testículo de los gatos descritos en la Tabla 2. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (40X).



**Tabla 1:** Parámetros testiculares macroscópicos (media $\pm$ SEM) de gatos tratados en la etapa postnatal con enantato de testosterona 12,5 mg (n=5) o placebo (n=5). No se hallaron diferencias entre los grupos para ninguno de los parámetros ( $p>0,1$ ).

	Enantato de testosterona	Placebo
Largo testicular (cm)	1,82 $\pm$ 0,06	1,77 $\pm$ 0,08
Ancho testicular (cm)	1,17 $\pm$ 0,04	1,42 $\pm$ 0,01
Peso testicular (g)	1,48 $\pm$ 0,06	1,65 $\pm$ 0,01
Volumen testicular (cm <sup>3</sup> )	0,21 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,21
Índice gonadosomático (%)	0,03 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,002

**Tabla 2:** Morfometría de las estructuras histológicas testiculares (media $\pm$ SEM) de gatos tratados en la etapa postnatal con enantato de testosterona 12,5 mg (n=5) o placebo (n=5). No se hallaron diferencias entre los grupos para ninguno de los parámetros ( $p>0,1$ ).

	Enantato de testosterona	Placebo
Eje tubular mayor ( $\mu$ m)	226,49 $\pm$ 28,28	260,86 $\pm$ 8,17
Eje tubular menor ( $\mu$ m)	146,31 $\pm$ 12,13	217,41 $\pm$ 38,03
Diámetro tubular medio ( $\mu$ m)	218,45 $\pm$ 21,23	236,46 $\pm$ 8,77
Área tubular ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	33183,23 $\pm$ 3682,4	40032,50 $\pm$ 3044
Perímetro tubular ( $\mu$ m)	713,27 $\pm$ 62,39	782,57 $\pm$ 26,25
Altura del epitelio germinal ( $\mu$ m)	46,20 $\pm$ 3,29	55,95 $\pm$ 3,54
Espermatogonias (cm <sup>3</sup> )	0,0006 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,01
Espermatocitos primarios (cm <sup>3</sup> )	0,06 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,04
Espermatocitos secundarios (cm <sup>3</sup> )	0,00 $\pm$ 9,76	0,00 $\pm$ 0,00
Espermátides redondas (cm <sup>3</sup> )	0,04 $\pm$ 0,008	0,09 $\pm$ 0,02
Espermátides elongadas (cm <sup>3</sup> )	0,01 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,01

Espermatozoides (cm <sup>3</sup> )	0,001±0,000	0,003±0,001
Células de Sertoli (cm <sup>3</sup> )	0,008±0,001	0,04±0,02
Células de Leydig (cm <sup>3</sup> )	0,01±0,001	0,02±0,006
Compartimiento intertubular (cm <sup>3</sup> )	0,06±0,01	0,17±0,07
Membrana basal (cm <sup>3</sup> )	0,008±0,001	0,009±0,005
Lumen (cm <sup>3</sup> )	0,02±0,009	0,11±0,04
Proporción tubular-intertubular	2,23±0,11	2,18±0,23
Largo tubular total (m)	6,30±1,10	13,24±4,66
Área nuclear células de Leydig (µm <sup>2</sup> )	31,36±0,67	32,30±0,70
Espermátides red./Espermatogonia	6,31±0,88	6,92±1,88

## Discusión

A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que describe el efecto de una única dosis suprafisiológica de andrógenos postnatales con fines contraceptivos en felinos domésticos. A pesar de que existe un amplio consenso con respecto al efecto adverso de los andrógenos postnatales en la morfología y funcionamiento del aparato reproductor de los machos de distintas especies, (Almirón y col., 1984; Baraño y col., 1981; Barraclough y Leathem, 1959; Compaan y col., 1991; Feigelson, 1986; Jacobsohn y col., 1965; Piacsek y Hostetter, 1984; Vanderstichele y col., 1987; Ventanas y col., 1992; Walczak-Jêdrzejowska y col., 2009; Wilson y Wilson, 1943) la comparación entre estos trabajos entre sí y con el presente estudio en felinos resulta dificultosa. Esto se debe a diferencias en las distintas especies consideradas, los andrógenos usados, las dosis, los periodos de administración y evaluación así como también los parámetros considerados en la respuesta a los tratamientos usados anteriormente.

En este estudio se demostró que una única dosis de T, administrada en machos felinos postnatos, no alteró la tasa de crecimiento corporal ni la edad a la pubertad. Similares hallazgos se encontraron en roedores y cerdos androgenizados neonatalmente (Baraño y col., 1981; Ventanas y col., 1992).

Contrariamente a lo descrito en ratas machos, donde similares protocolos provocaron una disminución de la libido (Diamond y col., 1973; Wilson y Wilson, 1943), en el presente trabajo todos los gatos estudiados demostraron un comportamiento sexual normal a la pubertad. Estas incongruencias podrían deberse a la diferente respuesta de los centros del comportamiento en las múltiples especies analizadas.

Contrariamente a lo reportado en trabajos similares previos en roedores y cerdos androgenizados, (Feigelson, 1986; Ventanas y col., 1992) que evaluaron niveles séricos de T, en los gatos aquí analizados las concentraciones fecales de esta hormona no se vieron afectadas por el tratamiento, salvo el incremento durante las 2 primeras semanas postnatales, producto de la administración exógena. A partir de ese momento, la T fecal conservó concentraciones basales durante todo el periodo de mediciones. Por otro lado, estos hallazgos hormonales en los felinos son semejantes a los hallados en otros trabajos en ratas en los cuales, luego de la androgenización neonatal, los niveles séricos de T se incrementaron post tratamiento, para luego descender hasta alcanzar concentraciones basales (Vanderstichele y col., 1987; Walczak-Jêdrzejowska y col., 2009).

En consonancia con lo encontrado en roedores y cerdos androgenizados neonatalmente (Almirón y col., 1984; Baraño y col., 1981; Compaa y col., 1991; Feigelson y col., 1986; Ventanas y col., 1992; Walczak-Jêdrzejowska y col., 2009), en este experimento, se observó una disminución, aunque no significativa, del peso, y volumen testiculares en el grupo ET. Igual efecto se produjo para el diámetro tubular, área tubular, espermatogonias, células de Sertoli, longitud tubular y la eficiencia espermática evaluada a través de la relación entre las espermátides redondas y las espermatogonias. La falta de significancia estadística en las diferencias macro y microscópicas podrían deberse al número de animales utilizados en cada grupo. Posiblemente, en un número mayor de gatos estas diferencias alcancen significancia. Estas inconsistencias, también podrían asociarse a las diferentes dosis usadas en los reportes. Por ejemplo, en el caso de roedores, usando una única dosis de 1 mg de propionato de

testosterona (PT) en los primeros días de vida, se observó una alteración leve de la espermatogénesis (Baraňao y col., 1981) mientras que administrando 2 mg de PT a ratas neonatas machos durante 35 días se obtuvo una atrofia testicular severa (Almirón y col., 1984).

Asimismo, todos los felinos manifestaron motilidad y morfología normal de los espermatozoides epididimales, sin diferencias entre los tratamientos. No se encontraron estudios en otras especies en los cuales se haya evaluado el semen epididimal luego de la androgenización neonatal, por lo que resulta imposible realizar comparaciones en este aspecto.

La fertilidad posterior al tratamiento con andrógenos postnatalmente fue evaluada en escasos estudios. En dichos estudios fue descripta una reducción de la fertilidad, coincidente con marcadas lesiones testiculares (Feigelson, 1986; Piacsek y col., 1984; Wilson y Wilson, 1943). En los felinos estudiados no se encontraron lesiones gonadales severas así como tampoco reducción en la fertilidad.

A partir de estos resultados se concluye que una única dosis de ET de 12,5 mg administrada en machos felinos postnatos, disminuyó, pero no alteró significativamente, el peso y volumen testicular, el diámetro y longitud de los túbulos seminíferos ni el volumen ocupado por espermatogonias y células de Sertoli. Se requieren más investigaciones para considerar el uso de andrógenos como estrategia farmacológica contraceptiva en felinos machos.

## Referencias

1. Almirón I, Domené H, Chemes HE. Hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. *J Androl.* 1984; 5: 235–42.
2. Baraño JL, Chemes HE, Tesone M, Chiauzzi VA, Scacchi P, Calvo JC, Faigon MR, Moguilevsky JA, Charreau EH, Calandra RS. Effects of androgen treatment of the neonate on rat testis and sex accessory organs. *Biol Reprod.* 1981; 25: 851-8.
3. Barraclough CA, Leathem JH. Influence of age on the response of male mice to testosterone propionate. *Anat Rec.* 1959; 134: 239-55.
4. Barraclough, CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinol.* 1961; 68: 68–79.
5. Berndtson WE, Igboeli G, Pickett BW. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Animal Sci.* 1987, 64: 241-6.
6. Boothe H. Testes Epididymies En: Slatter, D. *Textbook of Small Animal Surgery.* Philadelphia, USA. Ed Saunders RW. 1993; p. 1331-5.
7. Brown J, Wakter S, Steinman K. *Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species.* Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA, 2008; p. 62.
8. Chen Y, Li L, Chen X, Zhang Q, Wang W, Li Y, Yang D. Ovarian volume and follicle number in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32: 700-3.
9. Compaa JC, De Ruiter AJ, Koolhaas JM, van Oortmerssen GA, Bi-La Bohus. Differential Effects of neonatal testosterone treatment on aggression in two selection lines of mice. *Physiology & Behavior.* 1991; 51: 7-10.
10. Diamond M, Llacuna A, Wong CL. Sex behavior after neonatal progesterone, testosterone, estrogen, or antiandrogens. *Hormones and Behavior.* 1973; 4: 73–88.

11. Feigelson M. Suppression of testicular maturation and fertility following androgen administration to neonatal male rats. *Biology of Reproduction*. 1986; 35: 1321-32.
12. Franca L, Godinho C. Morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 2003; 68: 1554-61.
13. Jacobsohn D, Norgren A. Early effects of testosterone propionate injected into 5 day old rats. *Acta Endocrinol*. 1965; 49: 453-65.
14. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. Canine and Feline. *Theriogenology*. Saunders, WB. Philadelphia. 2001; p. 592.
15. Lin C, Huang W, Chen K. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer. *J Androl*. 2009; 30: 685-9.
16. Mattoon JS, Nyland TG. Ultrasonography of the genital system. En: Nyland JS, Mattoon TG. *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. Ed Saunders, WB. Philadelphia, 1995; p. 141-64.
17. Piacsek BE, Hostetter MW. Neonatal androgenization in the male rat: evidence for central and peripheral defects'. *Biol Reprod*. 1984; 30: 344-51.
18. Plumb DC. *Manual de farmacología veterinaria*. 5ta. ed. Buenos Aires. Argentina. Ed Inter-Médica. 2006; p. 680-82.
19. Risso A, De la sota P, Garcia P, Diaz J, Corrada Y, Blanco P, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de progesterona fecal en el gato doméstico. *Analecta Vet*. 2010a; 30: 5-8.
20. Risso A, Iglesias M, García Romero G, Valiente C, Diaz J, Corrada Y, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico: reporte preliminar. *InVet*. 2010b; 12: 53-8.
21. Schulz KM, Richardson HN, Zehr JL, Osetek AJ, Menard TA, Sisk CL. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Horm Behav*. 2004; 45: 242-9.

22. Soler AJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Garde JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology*. 2005; 64: 1503-17.
23. van den Dungen H, van Dieten J, Tilders F, van Rees G, Schoemaker J. Administration of a GnRH-antagonist to immature rats affects subsequent female and male pubertal development differently. *Acta Endocrinol*. 1989; 120: 778-84.
24. Vanderstichele H, Eechaute W, Lacroix E, Leusen I. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat. *J Steroid Biochem*. 1987; 28: 421-27.
25. Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. *Exp Clin Endocrinol*. 1992; 99: 119-22.
26. Walczak-Jędrzejowska R, Sowikowska-Hilczek J, Katarzyna Marchlewska K, Oszukowska E, Krzysztof Kula. Administration of testosterone inhibits initiation of seminal tubule growth and decreases Sertoli cell number in the earliest period of rat's postnatal development. *Folia Histochemica Et. Cytobiologica*. 2009; 47: 149-54.
27. Wilson JG, Wilson HC. Reproductive capacity in adult male rats treated prepuberally with androgenic hormone. *Endocrinology*. 1943; 33: 353-60.

## CONCLUSIONES FINALES

- En las hembras felinas, la administración postnatal de un andrógeno de larga acción, el ET, redujo aunque sin alterar significativamente, el número de folículos primarios y secundarios. Sin embargo, ocasionó una alta proporción de infertilidad anovulatoria, muy probablemente como consecuencia de la alteración de los mecanismos hipotalámicos que rigen los patrones cíclicos de liberación de las gonadotrofinas.
- Por otro lado, este disruptor indujo una reducción del área ocupada por las glándulas endometriales y del mismo modo una disminución en la altura del epitelio glandular y luminal uterino. Incluso, una de las hembras que demostró ovulación no presentó preñez, sugiriendo una anomalía funcional uterina.
- La administración del mismo protocolo farmacológico en los machos felinos postnatos, produjo una disminución, aunque no significativa, en relación al peso y volumen testicular, diámetro y longitud, volumen de espermatogonias y células de Sertoli. Futuros estudios en un mayor número de animales podrían fortalecer este hallazgo.
- Ninguno de los felinos machos tratados con ET presentó efectos clínicos colaterales locales ni sistémicos relacionados al tratamiento, sin embargo las hembras tratadas presentaron efectos secundarios físicos leves y reversibles.
- En conclusión, la disrupción endócrina con un andrógeno de larga acción como el ET durante la ventana crítica postnatal de desarrollo reproductivo felino podría constituir una herramienta contraceptiva permanente y segura para la especie.



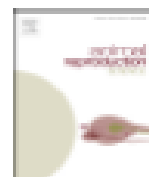
- Esta Tesis alienta la elaboración de futuros estudios a fin de obtener un protocolo farmacológico definitivo que podría constituir una estrategia anticonceptiva recomendable en la especie felina.

## **PUBLICACIONES**



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)

## Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats



Lucía Demaldé, Mariana Lopez Merlo, Rosario Vercellini, Claudio G. Barbeito, Patricia Fernandez, Cristina Gobello<sup>a</sup>

*Laboratory of Reproductive Physiology, National University of La Plata-CONICET, Argentina*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 March 2016

Received in revised form 26 May 2016

Accepted 31 May 2016

Available online 2 June 2016

#### Keywords:

Postnatal

Testosterone

Anovulation

Endocrine disruption

Felid

### ABSTRACT

To test the hypothesis that in domestic cats, postnatal androgens induce sterility, the aims of this study were to describe the reproductive effects and the clinical safety of a postnatal administration of a long term release androgen in this species. Thirteen newborn littermate female kittens were randomly assigned to one of the following treatment groups within the first 24 h of birth: testosterone enanthate 12.5 mg sc (TE; n= 8) or Placebo (PL; n= 5). The animals were subsequently assessed for fecal sexual hormones until puberty was attained and subsequently when matings occurred. After 21 days, ovulation and gestation were diagnosed. All queens were subsequently ovario-hysterectomized. Fecal testosterone concentrations differed between the treatment groups throughout the study period ( $P < 0.05$ ) being greater during the first 2 postnatal weeks in those of the TE group ( $P < 0.01$ ). Fecal estradiol was not affected by treatment ( $P > 0.1$ ). While all the females were receptive during the pubertal estrus ( $P > 0.1$ ), two TE (2/8) compared with all (5/5) females of the PL group had ovulations ( $P < 0.05$ ). Only one (1/2) compared with three (3/5) of the queens of the TE and PL groups, respectively became pregnant. All kittens of the TE group had transient clitoral enlargement. Anovulatory TE-treated cats had no corpus luteum, and a significant diminution of the endometrial glands as well as of the height of the uterine epithelium. It is concluded that, in domestic cats, a single postnatal supra-physiological dose of testosterone caused a large proportion of queens to be anovulatory and there were also histological endometrial abnormalities that also occurred with this treatment that were accompanied by mild and transient side effects.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Domestic cat (*Felis catus*) overpopulation is an insurmountable problem in almost all the countries of the world. Female cats are extremely prolific breeders and can reproduce from early puberty (e.g. 4 month) until death (Johnston et al., 2001). Furthermore, from the equator to areas with temperate photoperiods domestic felids breed

throughout the year (Faya et al., 2011). In developing countries, unwanted kittens are simply abandoned to suffer and die on the streets being problematic to both the animals themselves and humans. Safe, efficient and practical pharmaceutical protocols are still needed to manage the feline overpopulation problem.

Sex steroids have organizational actions during late gestation and early postnatal life in both altricial and precocial species such as mice, rats and sheep (Jackson et al., 2013). Specifically, during the early postnatal period the developing central nervous system is sensitive to the organizing

<sup>a</sup> Corresponding author.

E-mail address: [cgobello@fcv.unlp.edu.ar](mailto:cgobello@fcv.unlp.edu.ar) (C. Gobello).

effects of androgens. In this respect, both genders normally differ in pattern of pituitary gonadotropin secretion and the male non-cyclic pattern of gonadotropin secretion is induced by the action of testicular androgens on the anterior hypothalamus during the postnatal period (Jackson et al., 2013).

In female rats, there exists a critical postnatal period when there is greater tissue differentiation sensitivity during which a single androgen administration permanently alters both the hypothalamic mechanisms which underlie "cyclic" gonadotropin release patterns and the target tissue response to estrogens (Gorski, 1971; Harris and Naftolin, 1970; Lobl, 1975; Lobl and Gorski, 1974; Mena et al., 1992). Androgenization of developmental tissues in neonatal pigs also resulted in anovulatory infertility (Ventanas et al., 1992). As a result, androgenized females are anovulatory, anestrus, and have altered uterine morphology and function as well as greater male behavioral expression than untreated females (Barracough and Gorski, 1961; Lobl and Maenza, 1977). When female dogs were injected postnatally with an androgen for 3 months, there was delayed puberty, anovulatory syndrome and complete lack of receptivity to males (Beach et al., 1983). Furthermore, rats injected on the first days of life with testosterone had ovarian atrophy (Pinilla et al., 1993).

Thus, androgen treatment early in life prevents ovulation as well as normal uterine function and sexual behavior and may have implications for development of this methodology as a contraceptive strategy for felids. To the best of the authors' knowledge the effect of postnatal androgenization has never been assessed in domestic cats.

To test the hypothesis that in domestic cats, similar to other mammals (Barracough and Gorski, 1961; Beach et al., 1983; Ventanas et al., 1992) exogenous androgens induce sterility if administered during the postnatal critical reproductive developmental period, the aims of the present study were to describe the clinical and histological reproductive effects of the postnatal administration of an androgen. Secondly, the clinical safety of the treatment was also assessed. For this purpose, testosterone enanthate, a potent, long term effective androgen (Plumb, 2015) which is inexpensive and available worldwide was selected as the endocrine disruptor for this experiment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and pharmacological protocols

Thirteen (five litters) newborn littermate female kittens from the National University of La Plata institutional cat colony were included in this study. The animals were sexed according to anogenital distance and identified at birth, reared under 14 h of light per day, weaned at the age of 40 days and fed premium commercial food and water *ad libitum*. This study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of the Veterinary School of the National University of La Plata and all experiments were conducted under the guidelines established in The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA.

The kittens of the same litters were randomly assigned to one of the following treatment groups within the first

24 h of birth: Testosterone enanthate 12.5 mg total dose (Testoviron Depot 250, Bayer, Argentina) subcutaneously (TE;  $n = 8$ ) or Placebo: 0.05 ml corn oil subcutaneously injection (PL;  $n = 5$ ). The dose was selected according to previous pilot studies in cats based on a classical animal model (Barracough and Gorski, 1961).

### 2.2. Physiological and anatomical assessments

All the animals were subsequently assessed for specific anatomical, behavioral, and physiological characteristics until the first indications of puberty occurred. During this assessment period, the animals were observed 1.5 h twice a day for evaluating sexual behavior and were physically examined and weighed once a week. Eventual appearance of clinical side effects was also recorded. Vaginal cytology (Mills et al., 1979) assessments were conducted three times per week after the third month of age. Puberty was defined by the finding of more than 80% superficial keratinized cells and a clean background in the vaginal smears accompanied by the typical estrous behavior (Johnston et al., 2001).

### 2.3. Fecal collection, extraction and hormone determinations

Fecal samples were collected weekly until the time of puberty and frozen for testosterone (T) and estradiol-17 $\beta$  (E2) determinations. Fecal collection was initiated at the end of the first postnatal week. For this purpose, each cat was confined in an individual cage with clean sanitary litter one night per week. During the first 4 weeks of age, the neonates had to be rectally stimulated by a thin plastic suppository attached to a string to obtain the sample. Fecal steroids were extracted using the methods described by Brown et al. (2008) and T (ng/ml) and E2 (pg/ml) were determined using electrochemiluminescence immunoassays (Elecsys Testo II and Estradiol II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Inter- and intra-assay coefficients of variation of the assays were <10% and sensitivity were 0.025 ng/ml and 12 pg/ml for T and E<sub>2</sub> kits, respectively. All fecal data were expressed on a wet-weight basis (Faya et al., 2013).

### 2.4. In vivo fertility test, ovulation and pregnancy diagnosis

As the female cats attained puberty, there was exposure to a fertile tomcat during the estrous period. Matings were observed and/or diagnosed by the presence of spermatozoa in the vaginal smears. Twenty-one days after the end of estrus, blood samples were taken for ovulation assessment by electrochemiluminescence immunoassay determination of serum progesterone (Elecsys Progesterone II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; P<sub>4</sub> > 5 ng/ml) and gestation was diagnosed by ultrasonic examination in all the females (Mattoon and Nyland, 1995).

### 2.5. Ovariectomies

Following assessments for pregnancy status, all queens were ovariectomized and the ovaries and uteri

were subjected to histological study. For the surgery, the animals were pre-medicated with atropine sulfate, (Atropine Sulfate, John Martin; 0.04 mg/kg, subcutaneously), acepromazine maleate (Acedan, Holiday; 0.03 mg/kg subcutaneously), and butorphanol (Torbutol Plus, Fort Dodge; 0.2 mg/kg, intramuscularly). Anesthesia was induced with sodium thiopental (Pentovet TM, Richmond; 8 mg/kg, intravenous). After the females were endotracheally intubated, anesthesia was maintained with isoflurane and oxygen in a closed system. A mid-line laparotomy was performed to excise the ovaries and uteri (Arnold, 2002). After surgery ketoprofen (Ketofen®, Fort Dodge; 1 mg/kg) was injected subcutaneously (once) and then orally every 24 h for 4 additional days. All the queens were then placed for adoption.

2.6. Gross and histomorphometrical examination

Immediately after surgery genital tracks were excised and ovaries and uteri were macroscopically examined and weighed. The ovaries were sectioned longitudinally, placed in Bouin's fixative for 12 h and placed in 70% alcohol and processed routinely with paraffin embedding. After processing, 5 µm serial sections were cut, mounted on slides, dyed, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol solutions and stained with hematoxylin and eosin. Follicles were classified as primordial (small oocyte surrounded by a single layer of squamous granulosa cells), primary (oocyte surrounded by a single layer of cuboidal cells), secondary (two or more layers of granulosa cells and a theca cell layer), antral (fluid-filled antrum, mural and cumulus granulosa cells and two or more layers of thecal cells) or atretic (degenerated granulosa cells and follicular fluid containing cellular debris as previously described; Bristol-Gould and Woodruff, 2006). The number of primordial, primary, secondary and antral follicles, corpora lutea, and atretic follicles per square millimeter was determined on a computer screen using 20 captured images (×20) per animal obtained from two, 3 mm-sections.

Uteri were sectioned longitudinally for internal inspection. Cross-sections (approximately 0.5–1 cm) were collected from a point midway between the external bifurcation and the tip of each uterine horn and processed as described for the ovaries. The uteri were examined for the presence or absence of endometrial glands. The area occupied by uterine glands per mm<sup>2</sup> of endometrium over the total area of each microscope field was measured by planimetry. The height of the glandular and luminal uterine epithelium was assessed counting 100 cells in a total of 10 images per uterus taken with a 10× objective while myometrial thickness was examined in a total of four images per uterus taken with a 4× objective.

All histological images were obtained from a microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10X) through an attached digital RGB video camera (Evolution VF Color, Q Imaging, USA) and digitalized in a 24 bit true color TIFF format. These images were analyzed using Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics (Silver Spring, MA, USA).

2.7. Statistical analysis

Quantitative and qualitative differences between TE and PL groups were conducted by Fisher Exact and Student's *t*-tests, respectively. Fecal T and E<sub>2</sub> concentrations were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Tukey comparison test. Data were expressed as (mean ± SEM) and the level of significance was set at *P* < 0.05 (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

Age (34 ± 2.6 compared with 33.0 ± 2.3 weeks; *P* > 0.1) and body weight (2.92 ± 0.7 compared with 2.76 ± 0.9 kg; *P* > 0.1) at puberty attainment did not differ between TE and PL groups. Fecal T concentrations differed between the treatments throughout the weeks of the study (*P* < 0.05) being greater in the TE than in PL groups during the first 2 postnatal weeks (*P* < 0.01; Fig. 1A). Conversely, fecal E<sub>2</sub>-17β concentrations varied during the study without differences between treatments (*P* > 0.1). Thus, in both groups, E<sub>2</sub> was elevated during the first 5 postnatal weeks (*P* < 0.01). The E<sub>2</sub> remained basal until 3–4 weeks before puberty when concentrations began to increase (Fig. 1B).

All TE-treated kittens had vulva and clitoris enlargement during postnatal weeks 3–13 and were of typical developmental size, thereafter. There was also one case (1/8) of transient mammary nodules in an animal of the TE-treatment group. In this case two 1.8 cm diameter nodules appeared in the pectoral and inguinal left mammary glands on week 27 and gradually decreased in size to week 39 at the time of spaying.

One kitten of the TE group displayed mounting behavior preceding puberty. All the females had normal estrous behavior, were receptive to males (*P* > 0.1) and were, therefore, repeatedly mated during the pubertal estrus. While all the cats of the PL group (5/5) had ovulations and three were pregnant when assessments occurred, ovulation occurred in two of eight females of the TE group (*P* < 0.05) and one of the females was pregnant at the time of assessment. In both groups, gestations progressed normally until the time of ovariohysterectomies when the examination of the excised uteri revealed four to five conceptuses.

Ovarian weight did not differ between animals in the TE and PL (0.17 ± 0.0 compared with 0.16 ± 0.0 g; *P* > 0.1) groups. Gross ovarian examination revealed follicles and corpora lutea in the animals that failed to and those

**Table 1**  
Ovarian gross and histologic variables (mean ± SD) of female cats; No differences (*P* > 0.05) were detected between groups.

Parameter	TE	Placebo
Length (cm)	1.02 ± 0.0	0.95 ± 0.0
Height (cm)	0.58 ± 0.0	0.65 ± 0.0
Weight (g)	0.16 ± 0.0	0.17 ± 0.0
Volume (cm <sup>3</sup> )	0.17 ± 0.0	0.30 ± 0.0
Primordial follicles/mm <sup>2</sup>	35.13 ± 15.0	38.67 ± 7.7
Primary follicles/mm <sup>2</sup>	6.80 ± 1.4	10.62 ± 1.8
Secondary follicles/mm <sup>2</sup>	0.95 ± 0.2	1.91 ± 0.7
Antral follicles/mm <sup>2</sup>	0.34 ± 0.0	0.08 ± 0.0
Atretic follicles/mm <sup>2</sup>	3.80 ± 0.6	3.64 ± 0.7

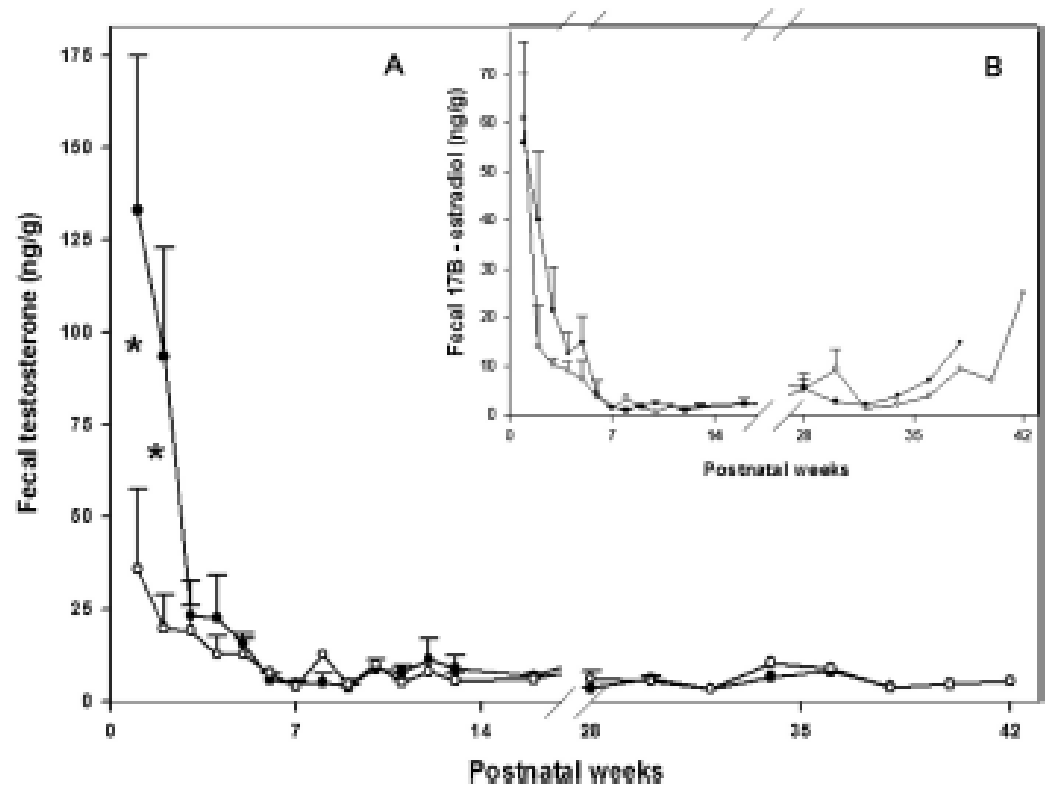


Fig. 1. Fecal testosterone (A;  $P < 0.05$ ) and estradiol-17 $\beta$  (B;  $P < 0.1$ ) concentrations (mean  $\pm$  SEM) of 13 female kittens treated postnatally with testosterone enanthate 12.5 mg (solid symbols) or a placebo (open symbols) and subsequently assessed until the first pubertal signs appeared for anatomical and behavioral characteristics; Asterisks over the symbols indicate selected differences ( $P < 0.01$ ) between groups.

that had ovulations, respectively. No further gross nor microscopical differences were detected between treatment groups for the ovarian variables that were studied (Table 1 and Fig. 2).

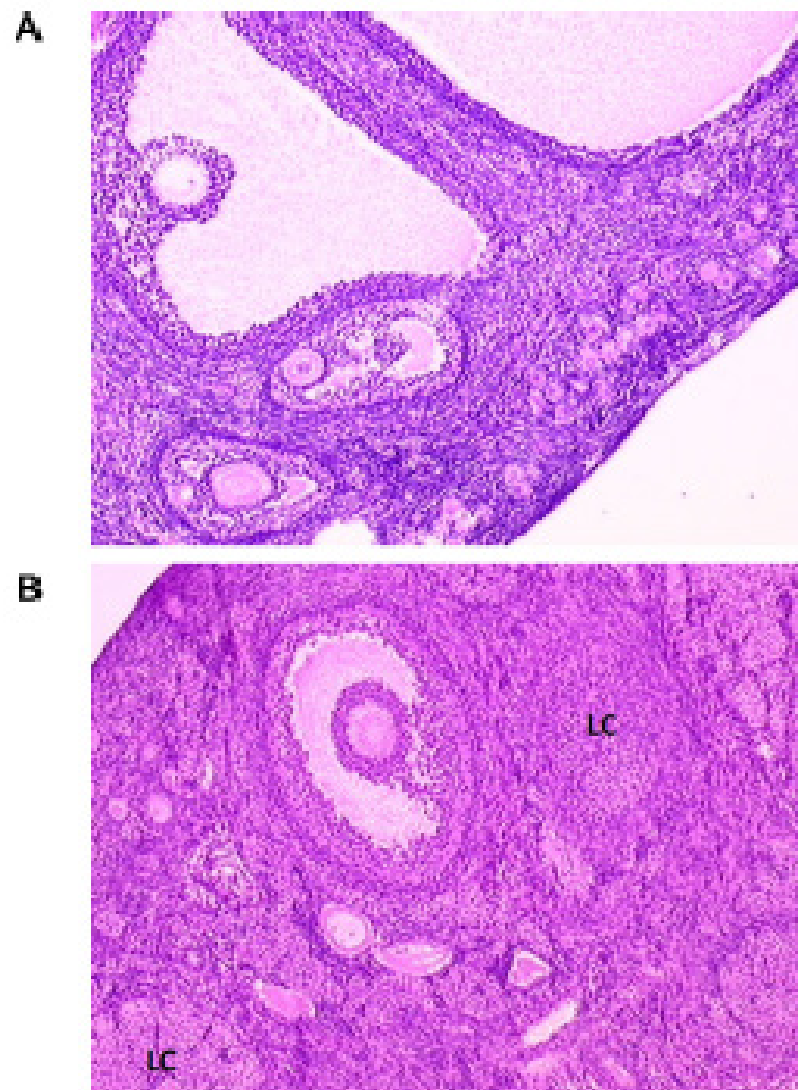
Gross external and internal uterine observations were normal in all but one queen in the TE group which was in estrus again at the time of surgery and had generalized abdominal hyperemia and a slightly increased bleeding. In this queen the entirety of the uterine horns and endometrium were also thicker than in the other cats.

Microscopic assessment of the uteri revealed that the area occupied by uterine glands per mm<sup>2</sup> of endometrium was smaller in the TE than in the PL group ( $0.34 \pm 0.01$  compared with  $0.49 \pm 0.03$ ;  $P < 0.01$ ). Conversely, the area occupied by stroma per mm<sup>2</sup> was larger in the TE queens ( $0.64 \pm 0.01$  compared with  $0.50 \pm 0.03$ ;  $P < 0.01$ ). The height of the glandular (mm;  $13.89 \pm 0.29$  compared with  $21.43 \pm 1.10$ ;  $P < 0.01$ ) and luminal (mm;  $8.09 \pm 0.39$  compared with  $9.44 \pm 0.42$ ;  $P < 0.05$ ) uterine epithelium were shorter in the TE than in the PL group (Fig. 3). Myometrial thickness did not differ between the two groups (mm;  $286.43 \pm 8.23$  vs.  $298.36 \pm 8.62$ ;  $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Although, postnatal androgenization effects have been reported in several mammalian species including dogs (Barracough and Gorski, 1961; Beach et al., 1983; Jackson et al., 2013; Lobl and Gorski, 1974; Ventanas et al., 1992), to the authors' knowledge, this is the first study that describes the effect of a single postnatal supra-physiological dose of a potent, time-released androgen on female cat reproduction. In the kittens of the present study, androgen treatment did not alter growth rate, age at puberty attainment nor estrous behavior and receptivity. Similarly, in postnatally androgenized rats, body weight did not differ from that of control animals (Almirón et al., 1984).

It is generally accepted that testosterone, when present for a period after birth, can permanently suppress development of female reproductive behavior but this premise is not consistent with findings in a previous study where sexual receptivity was not affected by testosterone treatment of female pigs early in life (Ford and Christenson, 1987). Conversely, normal sexual behavior was abolished in neonatally-androgenized rodents and bitches (Beach et al., 1983; Gogan et al., 1980; Thomas et al., 1983). These inconsistencies in results may be due to dose and species



**Fig. 2.** Ovaries (hematoxylin and eosin, 4 $\times$ ) of female cats; Animals treated with testosterone enanthate (A) or placebo (B); No significant differences ( $P > 0.05$ ) were detected between groups for any ovarian structure except for the presence of luteal cells (LC) in the testosterone-treated cats.

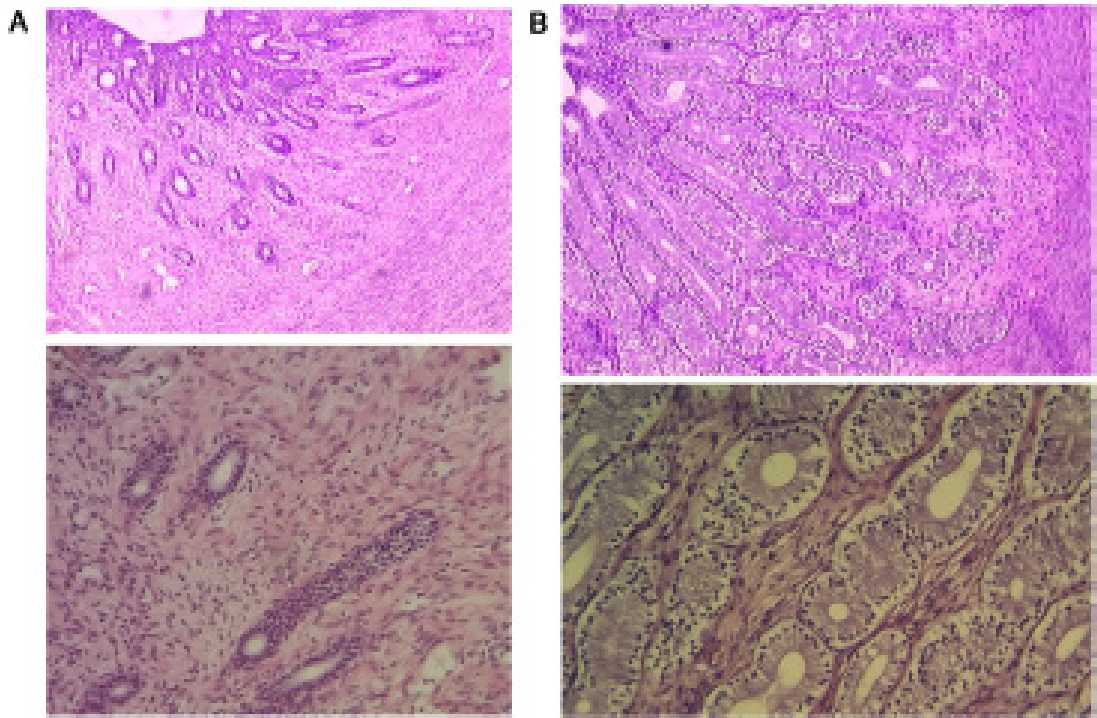
differences in the behavioral response to postnatal testosterone.

The increased fecal T during the first 2 postnatal weeks in the kittens of the TE group in the present study clearly indicates the exogenous effects of the hormonal treatment on anatomical and behavioral characteristics in cats and defines the time period of the “the critical period” to permanently differentiate sexual reproductive function in this species. Conversely, fecal  $E_2$  does not seem to be affected by androgen treatment. Furthermore, the augmented  $E_2$  concentrations during the first 5 postnatal weeks could be due to an endogenous origin (Faya et al., 2013).

The transient vulvar and clitoris abnormalities and the mounting behavior observed in all and one the TE-treated cats, respectively, are evidence of the peripheral effects of testosterone. Furthermore, these changes were expected

according to previous reports in other postnatally androgenized species (Brown et al., 1990; Morali et al., 1985).

Consistent with findings in the present study with what has been extensively described for other mammals (Jackson et al., 2013), the hypothalamic-pituitary-ovarian axis functionality was probably affected in most of these queens as 75% of the TE-treated animals were anovulatory. It is assumed that anovulation resulted from an androgen-induced disorder of the postnatal hypothalamus and the subsequent change in the release pattern of luteinizing hormone from the pituitary gland (Barradough, 1961; Wagner et al., 1966). This supports the hypothesis that the hypothalamus is sensitive, at least in part, to programming by postnatal steroids in this altricial species. Both the absence of luteal tissue and ovarian abnormalities in the testosterone-treated cats that were anovulatory



**Fig. 1.** Uteri (hematoxylin and eosin, 4 $\times$  and 20 $\times$ ) of 13 female cats; Animals treated with testosterone enanthate (A and M) or placebo (B and N); Notice fewer ( $P < 0.01$ ) endometrial uterine glands in the testosterone-treated cats (A and M).

suggest the central origin of the infertility in these cats. It could also be possible that postnatal testosterone might alter target tissue receptor sensitivity and, therefore, response to hormones.

Similarly to what has been described for other endocrine disruptors in postnatal cats (Carranza et al., 2014), differences in individual response may have also accounted for the findings in the present study. It is worth noting that a dose effect has been previously described for aromatizable and non-aromatizable androgens in the induction of anovulatory syndrome in rats (Aral et al., 1981; Gorski and Barraclough, 1963). Although a larger testosterone dose may have decreased or eliminated the variability of anovulation in the present study, the possibility of use of a larger dose for this purpose does not appear to be feasible as there would likely be an increase in the prevalence and severity of side effects.

The follicles from which ovulation did not occur might have functioned to increase estrogens in the bloodstream and may have led to the notable inflammation, hemorrhages, and hyperplasia in the endometrium in the testosterone-treated queen of the present study which was spayed while in estrus. These abdominal findings were similar, in some aspects to those described for human ovarian hyper-stimulation syndrome which is characterized by multiple ovarian cysts and subsequent hyper-estrogenemia (Jones et al., 1987).

The mammary nodules in the TE-group of the present study were not histologically examined and the transient existence suggests a non-neoplastic etiology. Similarly, postnatal dihydrotestosterone treatment resulted in the stimulation of mammary development at advanced ages in female mice (Yanai et al., 1981). Importantly, it should also be taken into account that the eventual long term undesired effects should not be discarded for the treatments used in the present study as these were not studied in the time frame of present trial.

Postnatal testosterone treatment, in the felids of the present study, reduced the area occupied by endometrial glands and cell development in both glandular and luminal epithelial tissues. Similar findings have been described in postnatal androgenized rats (Arutiunian et al., 1987) and also in progesterone-treated postnatal dogs (Willborn et al., 2014). As normal endometrial glands are required for establishment and maintenance of pregnancy the question about a concomitant uterine infertility arises and remains to be unveiled in most of these anovulated testosterone treated females. Normal uterine functionality could only be ascertained in the pregnant androgenized female of the present study. Inconsistent with what has been found in postnatal androgenized rats (Lobl and Maenza, 1977), no variations in myometrium thickness was found in the present feline study.

It is concluded that a single postnatal supra-physiological dose of testosterone enanthate caused a



large proportion of queens to be infertile due to anovulation and histological endometrial abnormalities were prevalent in these cats. Furthermore, this pharmacological protocol seemed to predispose queens to mild reversible physical side effects. More knowledge is necessary before these pharmacological protocols could be widely recommended as a contraceptive strategy in female cats.

Conflict of interest

None of the authors of this article has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This study was partially funded by the National Agency of Research and Technology, Argentina (PKT 2014 0426), Argentina. MLP and RV are Research Fellows and CGB, and CG are Career Scientists of CONICET, Argentina.

References

Almström, I., Domarö, H., Chermak, H.E., 1984. Hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. *J. Androl.* 5, 235–242.

Arai, Y., Yamamoto, K., Mizukami, S., Yanai, R., Shibata, K., Nagasawa, H., 1981. Induction of anovulatory sterility by neonatal treatment with 5 beta-dihydrotestosterone in female rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 96, 409–442.

Arnold, E., 2002. Ovary and uterus. In: Slatter, D. (Ed.), *Textbook of Small Animal Surgery*, 3rd ed. Saunders, R.W., Philadelphia, pp. 1406–1408.

Arutunian, N.A., Prohman, F.J., Savchenko, D.N., Skopich, V.G., Seleznova, E.N., 1987. Morphological characteristics of the uterine reaction of androgenized rats in the neonatal period to the administration of sex steroids. *Probl. Endocrinol. (Mosk)* 33, 50–61.

Barradough, C.A., Gorski, R.A., 1981. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68, 68–79.

Barradough, C.A., 1981. Production of anovulatory: sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68, 62–67.

Beach, F.A., Buchler, M.G., Dunbar, J.F., 1982. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. *Behav. Neural Biol.* 38, 1–21.

Bibiel-Gould, S., Woodruff, T.K., 2006. Folliculogenesis in the domestic cat *Felis catus*. *Theriogenology* 66, 5–13.

Brown, G.R., Neilson, C.M., Fraser, H.M., Dixon, A.F., 1999. Manipulation of postnatal testosterone levels affects phallic and clitoral development in infant rhesus monkeys. *Int. J. Androl.* 22, 119–128.

Brown, J., Walker, S., Steinman, K., 2008. *Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non Domestic Species*. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, VA, pp. 62.

Carranza, A., Faya, M., Merlo, M.L., Batista, P., Gobello, C., 2014. Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. *Theriogenology* 1 (E2), 138–142.

Faya, M., Carranza, A., Prieto, M., Abaya, M., Diaz, J.D., Gobello, C., 2011. Domestic queens under natural temperate photoperiod do not manifest seasonality. *Anim. Reprod. Sci.* 129, 78–81.

Faya, M., Carranza, A., Miotto, R., Ponchon, T., Furlan, P., Gobello, C., 2012. Fetal estradiol-17 $\beta$  and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology* 80 (5), 584–586.

Ford, J.J., Christenson, R.K., 1987. Influence of pre- and postnatal testosterone treatment on demasculinization of sexual receptivity in pigs. *Biol. Reprod.* 36, 581–587.

Gogan, F., Beattie, I.A., Hery, M., Laplanche, E., Kordon, D., 1980. Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon estradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J. Endocrinol.* 85, 69–74.

Gorski, R.A., Barradough, C.A., 1982. Effects of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology* 73, 210–216.

Gorski, R.A., 1971. Lesion effects on hypothalamohypophyseal function. *Neurosci. Res. Program Bull.* 9, 263–268.

Harris, G.W., Nafolin, R., 1970. The hypothalamus and control of ovulation. *Br. Med. Bull.* 26, 3–9.

Jackson, L.M., Mytinger, A., Roberts, E.K., Lee, T.M., Foster, D.L., Padmanabhan, V., Jansen, H.T., 2012. Developmental Programming: postnatal steroids complete prenatal steroid actions to differentially organize the GnRH surge mechanism and reproductive behavior in female sheep. *Endocrinology* 154, 1612–1623.

Johnson, S.D., Root-Kuritz, M.V., Olson, P.N.S., 2001. *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders, W.B., Philadelphia, pp. 592.

Jones, H.M., Vernon, M.W., Rush, M.E., 1987. Systematic studies invalidate the neonatally androgenized rat as a model for polycystic ovary disease. *Biol. Reprod.* 36, 1253–1265.

Lebl, R.T., Gorski, R.A., 1974. Neonatal intrahypothalamic androgen administration: the influence of dose and age on androgenization of female rats. *Endocrinology* 94, 1325–1330.

Lebl, R.T., Maenza, R.M., 1977. The ontogeny of uterine pathology and pathophysiology following neonatal androgen administration. *Biol. Reprod.* 16, 182–189.

Lebl, R.T., 1975. Androgenization: alterations in the mechanism of oestrogen action. *J. Endocrinol.* 66, 79–84.

Mattoon, J.S., Nyland, T.G., 1995. Ultrasonography of the genital system. In: Nyland, J.S., Mattoon, T.G. (Eds.), *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. Saunders, W.B., Philadelphia, pp. 141–164.

Mena, M.A., Arriaza, C.A., Tchernitchin, A.N., 1982. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biol. Reprod.* 46, 1080–1085.

Mills, J.N., Vail, V.E., Larnaden, J.H., 1979. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can. Vet. J.* 20, 95–101.

Morall, G., Carrillo, L., Beyer, C., 1985. Neonatal androgen influences sexual motivation but not the masculine copulatory motor pattern in the rat. *Physiol. Behav.* 34, 267–275.

Pirilla, L., Trimiffo, E., Gamelo, P., Bellido, C., Aguilar, R., Gaytan, F., Aguilar, E., 1992. Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. *J. Reprod. Fertil.* 57, 13–20.

Plumb, D.C., 2015. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*, 8th ed. Wiley-Blackwell, 1296.

Thomas, D.A., Howard, S.B., Barfield, R.J., 1982. Influence of androgen on the development of sexual behavior in the rat. II. Time and dosage of androgen administration during the neonatal period and masculine and feminine copulatory behavior in females. *Horm. Behav.* 17, 208–215.

Ventanas, J., López-Rote, C.J., García, C., 1992. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. *Exp. Clin. Endocrinol.* 99, 119–122.

Wagner, J.W., Erwin, W., Critchlow, V., 1966. Androgen virilization produced by intracerebral implants of testosterone in neonatal female rats. *Endocrinology* 79, 1135–1142.

Wilborn, R.R., Wiley, A.A., Brennan, K.J., Johnson, A.K., Fraser, N.S., Dujovne, G.A., Cooke, P.S., Bartol, F.F., 2014. Neonatal exposure to medroxyprogesterone acetate alters canine uterine development. *Clin. Theriogenol.* 6, 344.

Yanai, R., Nagasawa, H., Mori, T., Nakajima, Y., 1981. Long-term effects of perinatal exposure to 5 alpha-dihydrotestosterone on normal and neoplastic mammary development in mice. *Endocrinol. Jpn.* 28, 231–234.